

# Riscos e Alimentos

---

## Óleos e Azeites



---

*Pesticidas no azeite virgem: qual o risco?*

*Possíveis contaminantes de óleos de fritura*

*Adulteração de Azeite*

---

## ÍNDICE

Editorial - **pág. 2**

Seminário “Avaliação de Riscos e Atividade Laboratorial na Segurança dos Alimentos” - **pág. 3**

Azeite e saúde - **pág. 4**

Pesticidas no azeite virgem: qual o risco? - **pág. 6**

Possíveis contaminantes de óleos de fritura - **pág. 12**

Marcadores de ADN para a autenticação de azeites - **pág. 18**

Adulteração de Azeite - **pág. 23**

A análise de alimentos e a deteção da fraude - **pág. 26**

Diversidade biológica da oliveira e autenticidade de azeites - **pág. 25**

Efeito do armazenamento e do processamento térmico na qualidade do azeite - **pág. 34**

Azeite e óleos vegetais monoinsaturados na preparação de alimentos: escolhas idênticas? - **pág. 38**

Óleo de louro - **pág. 43**

## Editorial

**Pedro Portugal Gaspar**  
*Inspetor Geral da ASAE*



A área científica da ASAE tem sido uma vertente da atuação desta autoridade menos conhecida do cidadão. Esta tendência tem vindo a ser contrariada e tem estado a receber uma forte aposta neste novo ciclo de gestão. A razão para tal prende-se com o facto de, estrategicamente, este enfoque permitir obter informação útil quer da área laboratorial quer da avaliação de riscos, com dados estatísticos, que sustenta tecnicamente a atividade operacional.

Na realidade, a ASAE sendo uma autoridade que reúne em termos de competências todas as vertentes da análise de risco, nomeadamente a avaliação, a gestão e a comunicação de risco, tem que assumir uma estratégia integrada usando para esse efeito todas as ferramentas disponíveis para que a sua atuação seja adequada, coerente e proporcional ao risco.

Nessa perspetiva a ASAE tem em desenvolvimento um plano de atividades relativo à área científica que permitirá durante este ano, concluir estudos que servem os interesses dos consumidores e que contam com a colaboração dos membros do Conselho Científico e dos painéis temáticos, contribuindo assim para uma avaliação mais completa. Como sabemos, a ciência não se coaduna com individualismo, sendo que apenas com a discussão de vários pontos de vista se poderá ter resultados consistentes.

É assim com muito orgulho que acompanho a sétima edição da revista científica “Riscos e Alimentos”, desta vez dedicada ao azeite, e que mais uma vez contou com a preciosa colaboração do Conselho Científico e Painéis temáticos, bem como de outros autores, o que veio em muito engradecer esta publicação.

O tema escolhido, e tal como referido no primeiro parágrafo, prende-se com a informação laboratorial que foi sendo colhida nos últimos tempos e que nos levou a identificar um assunto a ter destaque em termos de comunicação de risco.

Quero agradecer publicamente a todos quantos contribuíram para que a edição desta revista fosse possível.

## Seminário “Avaliação de Riscos e Atividade Laboratorial na Segurança dos Alimentos”

**Graça Mariano**

*Diretora de Serviços*

*Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios/ASAE<sup>1</sup>*

A ASAE organizou no dia de 25 de Junho de 2014, no Campus do Lumiar o Seminário subordinado ao tema “**Avaliação de Riscos e Atividade Laboratorial na Segurança dos Alimentos**”. Este seminário contou com a participação de S. Ex.<sup>a</sup> o Secretário Estado Adjunto e da Economia, Dr. Leonardo Mathias, bem como representantes das diversas entidades nacionais e europeias relacionadas com a avaliação de riscos e atividade laboratorial na segurança de alimentos.

Durante o seminário realizou-se a cerimónia de tomada de posse, respetivamente do Conselho Científico da ASAE<sup>2</sup> e dos membros dos cinco Painéis Temáticos: Aditivos e Contaminantes da Cadeia Alimentar; Alimentação, Saúde e Bem-Estar Animal; Nutrição e Alergias Alimentares; Riscos Biológicos; Fitossanidade e OGMs. Considera-se assim, que estão reunidas as condições organizativas para que o Conselho Científico coadjuvado pelos Painéis temáticos possam ter uma participação ativa no processo da avaliação de risco, nomeadamente na emissão de pareceres científicos, na área da segurança alimentar.



O seminário foi constituído por quatro painéis compostos por oradores de diferentes entidades públicas ou privadas intervenientes nos diferentes temas:

1. A avaliação e Comunicação de Risco em Portugal (CC da ASAE);
2. Cooperação Científica no Panorama Europeu (EFSA<sup>3</sup>, AECOSAN<sup>4</sup>, ASAE);
3. Perspetivas da atividade Laboratorial em Portugal (INIAV<sup>5</sup>, GLOBALAB, SGS, ASAE, INFARMED<sup>6</sup>, RELACRE<sup>7</sup> e BIOPREMIER;

4. Acreditação na Atividade Laboratorial (IPAC<sup>8</sup>, RELACRE, ASAE).

A recolha e análise de dados que possibilitem a caracterização e a avaliação dos riscos na segurança alimentar, o assegurar a comunicação pública e transparente dos riscos e a promoção e divulgação da informação sobre segurança alimentar junto dos consumidores, são parte integrante da vertente preventiva da ASAE. Neste âmbito, a ASAE é o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, quer a nível europeu quer internacional, atuando como ponto focal da EFSA em Portugal para questões técnicas e científicas relacionadas com avaliação e comunicação de risco em segurança alimentar. Assim, a EFSA também esteve representada no painel II, através da presença do Dr. Sérgio Rodeia que apresentou o tema: “Instrumentos para a cooperação científica entre Portugal e a EFSA”.

Pretendeu-se com este seminário dar também enfoque à acreditação como ferramenta fundamental de apoio ao controlo oficial, quer a nível de prevenção quer a nível da inspeção. Nesta perspetiva, o ultimo painel do seminário, foi construído tendo em conta os laboratórios acreditados da ASAE e os diferentes parceiros no contexto da atividade laboratorial. Como corolário deste painel, foi identificada a importância da acreditação, como garante da credibilidade do controlo dos géneros alimentícios colocados no mercado. Os laboratórios da ASAE tem já um histórico de 15 anos acreditação, e um anexo técnico com 121 ensaios laboratoriais acreditados.

<sup>1</sup> DRAL/ASAE - Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios/Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

<sup>2</sup> CC ASAE - Conselho Científico da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

<sup>3</sup> EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

<sup>4</sup> AECOSAN - Agência Espanhola de Consumo, Segurança Alimentar e Nutrição

<sup>5</sup> INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

<sup>6</sup> INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

<sup>7</sup> RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal

<sup>8</sup> IPAC - Instituto Português de Acreditação

## Azeite e saúde

**Marina Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Ferreira<sup>1</sup>, Marta Rocha<sup>1</sup>, Patrícia Padrão<sup>1</sup>, Pedro Graça<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto

Na bacia do Mediterrâneo, o **azeite**, aliado aos cereais integrais, a hortofrutícolas, a frutos gordos e a quantidades moderadas de carnes magras (preferencialmente brancas), pescado, vinho tinto e laticínios, constitui um padrão alimentar potenciador de saúde, com benefícios marcados na longevidade das populações <sup>(1)</sup>.

A Alimentação Mediterrânica (AM), considerada Património Imaterial da Humanidade pela UNESCO em dezembro de 2013, foi primeiramente descrita nos anos 50-60 pelo professor *Ancel Keys*, que observou menor incidência de morbilidade e mortalidade por doença coronária nas populações da região do Mediterrâneo, comparativamente aos EUA e aos países do norte da Europa <sup>(2, 3)</sup>. Efetivamente, na atualidade a evidência científica é crescente no que respeita à associação entre a adoção da AM como padrão de alimentação e a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardio e cerebrovasculares, de diabetes mellitus tipo 2, obesidade e de vários tipos de cancro <sup>(4-8)</sup>. Sendo o azeite um componente-chave da AM, os benefícios referidos devem-se em parte ao seu consumo pelas populações do Mediterrâneo como principal fonte de gordura alimentar, já que este é constituído por vários compostos bioativos (ácido oleico, compostos fenólicos, esqualeno, entre outros) que conferem a este alimento propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas muito particulares <sup>(9-13)</sup>, e que exprimem a sua atividade máxima na variedade “virgem extra”.

De facto, os trabalhos iniciais sobre os efeitos benéficos do consumo de azeite foram atribuídos quase exclusivamente à sua elevada composição, cerca de 78,6%, em ácidos gordos monoinsaturados. Contudo, e progressivamente, foram sendo valorizados os seus componentes minoritários como fosfolípidos, ceras, hidrocarbonetos, pigmentos, esteróis (vulgarmente chamados de fitoesteróis), o esqualeno (o hidrocarboneto mais importante), tocoferóis e compostos fenólicos. Entre estes vale a pena destacar os álcoois fenólicos (como o hidroxitirosol e o tirosol), a oleuropeína e o oleocantal pela sua forte bioatividade <sup>(14)</sup>. Substâncias como

o hidroxitirosol ou a oleuropeína são potentes agentes antioxidantes podendo explicar a capacidade protetora sobre a célula <sup>(15)</sup>. Por sua vez, a atividade anti-inflamatória atribuída ao oleocantal parece provocar uma diminuição de alguns mediadores inflamatórios <sup>(16, 17)</sup>.

Desta forma, deve privilegiar-se o seu consumo, não só a nível da culinária (cozinhados e temperos), mas também nas entradas ou nos lanches, seguindo-se o exemplo espanhol do pão rústico com tomate, alho, orégãos e azeite em detrimento de manteigas, patés e outros molhos com pouco interesse nutricional <sup>(18)</sup>.

Em suma, o consumo de azeite, sobretudo como parte integrante da AM e de um estilo de vida saudável, tem sido associado a uma diminuição da probabilidade de ocorrência de alguns cancros, doenças cardiovasculares (especialmente o azeite virgem extra <sup>(19)</sup>), doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus tipo 2 <sup>(13, 20, 21)</sup>. Curiosamente, alguns estudos mostram que, embora o azeite seja uma gordura e por isso com 9kcal por grama, o seu consumo não parece aumentar o risco de desenvolver excesso de peso ou obesidade <sup>(22)</sup>, podendo até diminuir o risco de obesidade infantil em crianças <sup>(23)</sup> – é, todavia, fundamental ampliar a investigação a este nível.

- 
1. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition*. 1995; 61(6 Suppl):1402s-06s.
  2. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *The American journal of clinical nutrition*. 1995; 61(6 Suppl):1321s-23s.
  3. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American journal of epidemiology*. 1986; 124(6):903-15.

4. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* (Clinical research ed). 2008; 337:a1344.
5. Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2010; 92(5):1189-96.
6. Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public health nutrition*. 2013:1-14.
7. Koloverou E, Esposito K, Giugliano D, Panagiotakos D. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014; 63(7):903-11.
8. Romaguera D, Norat T, Mouw T, May AM, Bamia C, Slimani N, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower abdominal adiposity in European men and women. *The Journal of nutrition*. 2009; 139(9):1728-37.
9. Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Alarcon-de-la-Lastra C. An update of olive oil phenols in inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Current medicinal chemistry*. 2013; 20(37):4758-76.
10. Uylaser V, Yildiz G. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014; 54(8):1092-101.
11. Hu T, He XW, Jiang JG, Xu XL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014; 62(7):1449-55.
12. Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*. 2012; 23(2):129-35.
13. Rodrigues M, Rocha M, Ferreira A, Padrão P. Azeite e Saúde. *Nutricias. APN*, 2012; 15:14-18.
14. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2007; 12(4):331-42.
15. Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, et al. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes & nutrition*. 2011; 6(1):63-9.
16. Iacono A, Gomez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, et al. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis and rheumatism*. 2010; 62(6):1675-82.
17. Pitt J, Roth W, Lacor P, Smith AB, 3rd, Blankenship M, Velasco P, et al. Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009; 240(2):189-97.
18. Carvalho P, Teixeira VH. 50 Super Alimentos Portugueses (mais 10!). *Matéria-Prima Edições*. 2012
19. Guasch-Ferre M, Hu FB, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, Bullo M, Estruch R, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC medicine*. 2014; 12(1):78.
20. Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, De Caterina R, Badimon L, Covas MI, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2010; 20(4):284-94.
21. Khalatbary AR. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutritional neuroscience*. 2013; 16(6):243-9.
22. Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, de la Fuente C, de Irala J, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA. Olive oil consumption and weight change: the SUN prospective cohort study. *Lipids*. 2006; 41(3):249-56.
23. Haro-Mora JJ, Garcia-Escobar E, Porras N, Alcazar D, Gaztambide J, Ruiz-Orpez A, et al. Children whose diet contained olive oil had a lower likelihood of increasing their body mass index Z-score over 1 year. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2011; 165(3):435-9.

## Pesticidas no azeite virgem: qual o risco?

**Sara C. Cunha, José O. Fernandes**

*REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*

### Resumo

O combate a doenças, pragas e infestantes nos olivais faz-se, na maioria das vezes, com o recurso ao uso de pesticidas, não sendo assim de estranhar a presença dos respetivos resíduos nos azeites. Esta presença de resíduos de pesticidas depende, entre outros fatores, da natureza da molécula ativa, das condições de aplicação (dose, periodicidade, modo de ação e de penetração), do intervalo de tempo decorrido entre o último tratamento e a colheita da azeitona e do tipo de processamento efetuado.

Neste artigo procurar-se-á abordar de uma forma concisa a importância de cada um desses fatores na avaliação da segurança alimentar do azeite. Procurar-se-á ainda responder às dúvidas sobre se os azeites virgens são mais ou menos suscetíveis à presença de resíduos de pesticidas quando comparados com os azeites refinados.

### Introdução

Os olivais são frequentemente afetados por um sem número de pragas (algodão da oliveira, o barrador, a cochonilha preta, a escama da oliveira, a traça da oliveira, a mosca da oliveira, entre outras) e por doenças (como a gafa, o olho de pavão, a tuberculose e o escude), responsáveis por perdas na produção de azeitonas tanto em termos quantitativos como da qualidade da matéria-prima, com as naturais repercussões no azeite produzido. O controlo do fitossanitário dos olivais é por isso fundamental para assegurar a manutenção da rentabilidade e da qualidade. Na maioria das vezes o combate a pragas, doenças e infestantes nos olivais faz-se com o recurso ao uso de pesticidas.

Sob a designação genérica de pesticidas incluem-se uma série de substâncias de natureza química diversa, geralmente dotadas de elevada toxicidade para o homem, que apresentam distintas funções e uma ação biológica diferenciada e que podem ser classificadas segundo diferentes critérios. O sistema de classificação mais comum divide os pesticidas em três grandes famílias, de acordo com o tipo de organis-

mo a combater: inseticidas, fungicidas e herbicidas. Podem referir-se ainda, sem pretensão de sermos exaustivos, outras famílias de menor significado como os nematocidas, os moluscicidas, os acaricidas e os rodenticidas. No grupo dos inseticidas (alguns dos quais apresentam também propriedades nematocidas e acaricidas) incluem-se diferentes grupos de compostos, classificados de acordo com a respetiva estrutura química, como por exemplo os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides. Os fungicidas incluem, entre outros, compostos como os benzimidazóis, os diazóis e os ditiocarbamatos. Os compostos nitrados, os carbamatos, as ureias e as triazinas constituem alguns das classes de compostos pertencentes à família dos herbicidas (Cunha, 2007).

Na União Europeia (EU) foram publicadas recentemente quatro medidas legislativas que fazem parte da designada “Estratégia Temática da Utilização Sustentável dos Pesticidas” que tem por principais objetivos: i) avançar na redução gradual do impacto dos pesticidas na saúde humana e no meio ambiente, ii) melhorar o controlo da utilização e distribuição de pesticidas, iii) reduzir os níveis de substâncias ativas prejudiciais ao homem, iv) incentivar o uso de boas práticas agrícolas, v) estabelecer um sistema transparente de comunicação e acompanhamento dos progressos realizados no cumprimento das medidas anteriores. Este pacote legislativo inclui:

- um Regulamento (1107/2009) relativo à colocação de produtos fitofarmacêuticos no mercado (que substitui a diretiva 91/414/CEE);
- uma Diretiva (128/2009) relativa à utilização sustentável dos pesticidas; desde 1 de Janeiro de 2014 todos os agricultores profissionais estão obrigados a seguir os princípios da Proteção Integrada, o que significa uma gestão adequada e integrada de todos os meios de luta disponíveis no quadro de uma Boa Prática Fitossanitária;



- um Regulamento (1185/2009) relativo às estatísticas sobre pesticidas, que permite ter à disposição estatísticas comunitárias harmonizadas e comparáveis sobre as vendas e a utilização de pesticidas;

- uma Diretiva (2009/127/CE) que veio alterar a chamada Diretiva “máquinas” (2006/42/CE) que se traduz na introdução de requisitos adicionais de proteção ambiental aplicáveis à colocação no mercado e à entrada em serviço das máquinas de aplicação de pesticidas.

Não obstante a legislação atualmente existente, a presença de resíduos de pesticidas nos azeites e outros alimentos continua a constituir um risco para a saúde humana, pois os mesmos podem interferir com os sistemas reprodutivos e com o desenvolvimento do feto e, em alguns casos, apresentam a capacidade de causar diversos tipos de cancro (Gilden et al. 2010), representando por conseguinte uma das principais preocupações de saúde pública relacionadas com a ingestão de alimentos. Dados relativos à avaliação de resíduos em diferentes alimentos obtidos nos países da União Europeia, referentes a 2011, mostram que, das 12 000 amostras analisadas, 53,4% não apresentavam resíduos, 44,7% apresentavam teores de resíduos inferiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estipulados e apenas 1,9% apresentavam teores de resíduos superiores aos LMR (EFSA 2014). O LMR representa a quantidade máxima permitida em que um pesticida pode existir num determinado produto agrícola. Em Portugal, os LMR são estabelecidos por lei e publicados em Diário da República com base na legislação da UE (Regulamento 396/2005), sendo por norma instituídos para alimentos não processados. No caso dos azeites, os valores estipulados são os que se aplicam às azeitonas destinadas ao fabrico de azeite. Nos olivais os inseticidas e fungicidas são os pesticidas mais usados para controlar pragas e doenças fúngicas, respetivamente. Entre os inseticidas usados nos olivais temos o fentião, fosmete, dimetoato, metidationa, carbaril, malatião, deltametrina, que pertencem ao organofosforado, carbamato, organoclorados, piretróides e outras classes químicas. Fungicidas (por exemplo, fosetil-Al, benomil) muitas vezes incluem ftalimidas, triazóis, imidazóis, sulfamidas e outras classes químicas (Tomlin, 2003). Outro tipo de pesticidas com grande aplicação nos olivais são herbicidas sulfoniluréias (por exemplo, éteres difenil), como é apresentado no quadro 1.

Tabela 1- Pesticidas nos azeites

Pesticidas	Grupo químico	Ação
Etil-azinfos	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Azadiractina	Tetranortriterpenóides	Inseticida
Carbaril	Carbamato	Inseticida
Clorpirifos	Organofosfato	Inseticida
a-Cialotrina	Piretróide	Inseticida
a- Cipermetrina	Piretróide	Inseticida
Deltametrina	Piretróide	Inseticida
Diazinão	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Diflufenicão	Piretróide	Inseticida
Dimetoato	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Diurão	Ureia	Herbicida
Endossulfão	Organoclorado	Inseticida/Acaricida
Etião	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Fenitrotião	Organofosfato	Inseticida
Fentião	Organofosfato	Inseticida
Formotião	Organofosfato	Inseticida
Lindano	Organoclorado	Inseticida
Malatião	Organofosfato	Inseticida
Metidatião	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Ometoato	Organofosfato	Inseticida
Oxifluorfena	Éter-difenil	Herbicida
Paratião	Organofosfato	Inseticida
Fosmete	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Pirimifos	Organofosfato	Inseticida/Acaricida
Terbutilazina	Triazina	Herbicida
Terbutrina	Triazina	Herbicida
Triclorfão	Organofosfato	Inseticida

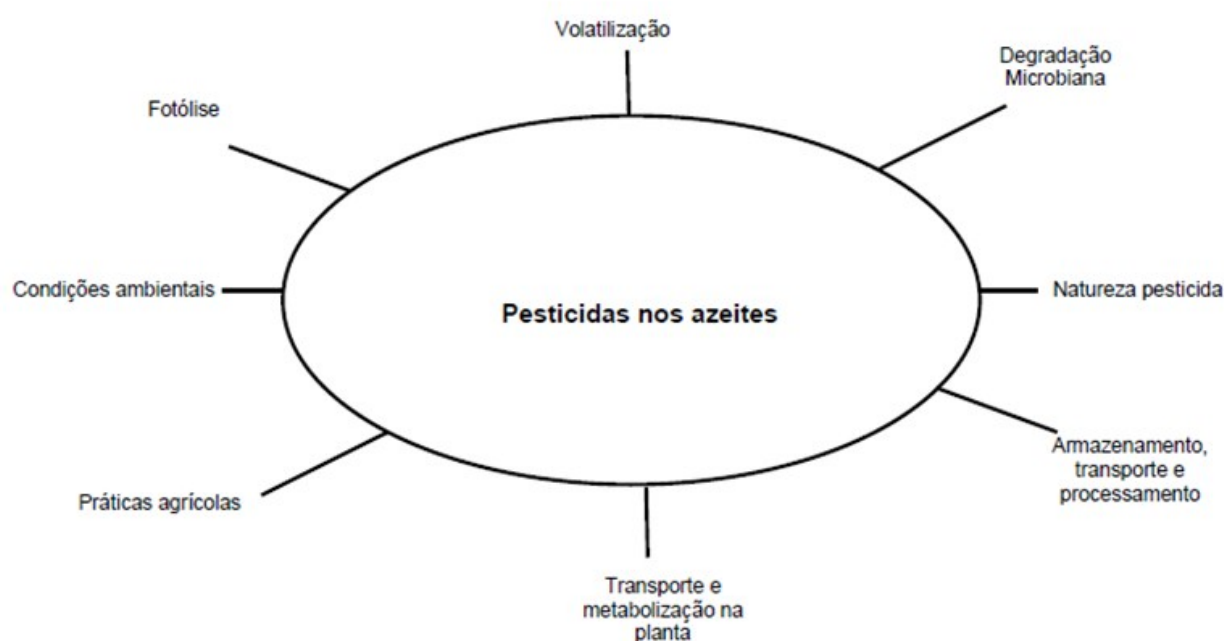
Os pesticidas quando aplicados nos olivais estão sujeitos a diferentes fatores, como ilustrado, na figura 1, que condicionam a prevalência dos resíduos resultantes nas azeitonas, tais como a natureza da molécula ativa, as condições de aplicação (dose, periodicidade, modo de ação e de penetração), o intervalo de tempo decorrido entre o último tratamento e a apanha do fruto, as condições ambientais, e o tipo de armazenamento, transporte e processamento efetuado.

Geralmente, os pesticidas organofosforados apresentam um elevado efeito tóxico sobre as pragas; contudo, manifestam igualmente elevada toxicidade aguda em mamíferos quando comparados com os organoclorados e os carbamatos. Não obstante, os organofosforados são geralmente considerados pesticidas seguros no tratamento das culturas devido à sua degradação relativamente rápida, enquanto os organoclorados evidenciam elevada persistência no ambiente e maior capacidade de bioacumulação na cadeia alimentar.

Após a aplicação o pesticida é absorvido pela superfície da planta (cutícula cerosa e raízes superficiais) podendo ser distribuído por todos os tecidos (pesticida sistémico) ou permanecer sobre a superfície da planta (pesticida de contacto). Enquanto ainda à superfície da planta (folhas ou frutos) o pesticida pode sofrer volatilização, fotólise química e/ou microbiológica. Todos estes processos podem reduzir a concentração original do pesticida, mas também podem levar à formação de outros compostos denominados metabolitos, que podem ser mais ou menos tóxicos que o original. A vola-

tilização do pesticida ocorre geralmente imediatamente após a aplicação no campo. O processo depende da pressão de vapor do pesticida; pesticidas com alta pressão de vapor tendem a volatilizar-se rapidamente para o ar, enquanto aqueles com baixa pressão de vapor tendem a permanecer mais tempo na superfície da planta. A taxa de volatilização depende também de fatores ambientais, como a temperatura e a velocidade do vento. Quanto mais rápida for a velocidade do vento e mais elevada for a temperatura, mais rapidamente ocorre a evaporação do pesticida. A fotólise ocorre quando as moléculas absorvem a energia da luz solar, resultando na degradação do pesticida. Idêntica reação pode ocorrer por via indireta em resultado da ação sobre os pesticidas de produtos resultantes da fotólise de outros compostos. Alguns pesticidas, por seu lado, podem ser degradados pelo metabolismo microbiano. Os microrganismos podem utilizar os pesticidas como “nutrientes”, decompondo-os, assim, em dióxido de carbono e outros produtos metabólicos (Holland e Sinclair 2004, Keikotlhaile e Spanoghe 2011).

Figura 1- Fatores que afetam os níveis de resíduos de pesticidas nos azeites.





Mesmo em idênticas condições de aplicação (quantidade de substância ativa e olival), o teor de resíduos de pesticidas nas azeitonas pode variar bastante entre os frutos, como constataram Farris et al. (1992). A variabilidade registada pode estar relacionada com o tamanho do fruto, com a cultivar e também com o momento da apanha.

Durante o armazenamento, transporte e processamento dos produtos agrícolas pode ocorrer a dissipação ou a concentração de resíduos de pesticidas. Em muitos casos, os resíduos de pesticidas são destruídos pelo processamento alimentar (aquecimento e esterilização). Em alimentos com elevado teor de gordura, contudo, pode ocorrer a sua concentração.

A maioria dos produtos agrícolas é consumida apenas após algum processamento. A lavagem e a limpeza, que são os passos iniciais na maior parte dos procedimentos de processamento, frequentemente reduzem os níveis de resíduos, particularmente no caso de pesticidas não sistémicos. Guarda-Rubio et al. (2006) observaram que a lavagem executada rotineiramente nos lagares de azeite promovia a descontaminação superficial de herbicidas nas azeitonas colhidas do chão. Porém, mesmo após a lavagem, o azeite obtido a partir de azeitonas apanhadas do chão apresentava concentrações de resíduos de herbicidas superiores aos obtidos a partir de azeitonas das árvores.

No processamento do azeite virgem, após a limpeza e a lavagem das azeitonas para remoção de folhas e terras, segue-se a moenda e a batedura em que a azeitona é triturada e transformada numa massa homogénea, o que proporciona a junção das gotículas de azeite que são extraídas posteriormente por decantação ou por centrifugação. Os azeites virgens são obtidos, exclusivamente, a partir de processos mecânicos e agrupam-se em três categorias conforme o grau de acidez livre e outros parâmetros (azeite virgem extra, azeite virgem e azeite lampante). Em média para se obter 1 litro de azeite são necessários 5 quilogramas de azeitonas, pelo que qualquer resíduo de pesticidas nas azeitonas pode ser teoricamente concentrado 5 vezes. Farris et al. (1992) reportaram que os pesticidas diazinão e metidatão se comportam dessa forma, tendo verificado ainda que para o paratão e o mecarbam, que apresentam igualmente grande afinidade com os lípidos, o fator de concentração foi de apenas 3 vezes. No entanto, na mesma experiência, o cloropiri-

fos apresentou o mesmo teor nas azeitonas e no azeite, enquanto que os resíduos de dimetoato foram mais baixos nos azeites do que nas azeitonas, o que poderá dever-se à sua elevada solubilidade na água. De forma similar, Cabras et al. (1997) mostraram que metil-azinfos, o diazinão, a metidatona, o metil-paratão, a rotenona e o quinalfos apresentam níveis mais elevados de resíduos em azeites do que nas azeitonas. Um fator de concentração (resíduos no azeite/ resíduos nas azeitonas) de 1.5 a 7 foi estabelecido em função do pesticida e da sua quantidade inicial nas azeitonas. De salientar que o fator de concentração registado no azeite não permitiu, contudo, em nenhum caso, que os teores registados ultrapassassem os LMRs estabelecido pela legislação.

Um estudo comparativo realizado ao longo de três anos em amostras de azeite obtidas a partir de olivais gregos convencionais e olivais convertidos à agricultura biológica permitiu concluir que nos olivais convencionais os teores de resíduos permaneceram constantes ao longo dos três anos, enquanto que nos olivais de agricultura biológica decresceram 84% no caso do fentião e 90% no caso do dimetoato (Tsatsaki et al. 2003). Em qualquer dos casos não foram ultrapassados os LMR estipulados por legislação.

Num outro estudo de três anos realizado na Grécia por Botitsi et al. (2004), referente à determinação de fentião e seus metabolitos em 48 amostras de azeite virgem, fornecidas por produtores, verificou-se que todos os valores determinados foram inferiores ao LMR legalmente estabelecido. De igual forma, Ballesteros et al. (2006) descrevem que em 15 amostras de azeite virgem fornecido por produtores da Andaluzia os valores de dimetoato, de metil-clorpirifos e de clorpirifos foram inferiores ao LMR legalmente estabelecidos. Sánchez et al. (2006) detetaram resíduos de fosmete em apenas uma de 25 amostras de azeite virgem analisadas, num teor de valor inferior ao LMR estipulado.

Um estudo realizado por Amvrazis e Albanis (2009) para a determinação de 35 pesticidas em 100 amostras (29 comerciais e 71 de produtores de agricultura convencional) de azeite grego, verificou que 10% das amostras obtidas de olivais convencionais não continham resíduos detetáveis, enquanto nas restantes amostras foram detetados 20 inseticidas. Os teores mais elevados referiam-se ao fentião, dimetoato e endossulfão.

Um estudo mais recente realizado em 2014 na Grécia (Likudis et al. 2014) refere que dos 70 azeites analisados com denominação de origem protegida ou com indicação geográfica protegida 4 amostras apresentaram resíduos de pesticidas que excediam os LMRs (3 amostras continham fentião e uma metil-paratião). Os resíduos de pesticidas mais prevalentes foram o penconazole (n= 20), endossulfão (n=18) e o flufenoxurão (n=16).

Estudos realizados em azeites com diferentes classificações verificaram que os azeites virgem apresentam teores superiores de resíduos de pesticidas que os azeites refinados (Ballesteros et al. 2006, Amvrazis e Albanis 2009, Cunha et al. 2010). Estas diferenças podem em parte ser explicadas pelo tipo de processamento. De forma geral, o azeite refinado (designado em Portugal apenas por azeite) é obtido a partir do azeite virgem por operações de refinação que envolvem a neutralização dos ácidos gordos livres com soluções alcalinas, ou a separação desses ácidos por destilação em ambiente rarefeito, bem como de descoloração com adsorventes inócuos e de desodorização pela passagem de vapor de água em ambiente rarefeito. Todas estas operações podem contribuir para o nível inferior de resíduos de pesticidas verificado no produto final.

Apesar dos teores de resíduos de pesticidas nos azeites ser na maior parte das vezes inferior ao LMR estipulado, estudos recentes mostram uma prevalência de alguns compostos que, a longo prazo, poderão exercer efeitos nefastos na saúde humana. Por exemplo o endossulfão, pesticida atualmente não permitido no tratamento dos olivais, foi detetado em 22% de um total de 338 amostras de azeite grego (Lentza-Rizo et al. 2001) e em 100% de um total de 31 amostras de azeites espanhóis (Ferrer et al. 2005, Guardia-Rubio et al. 2006).

Outro aspeto importante reside na presença de metabolitos que podem ser mais tóxicos do que os pesticidas originais. Cunha et al. (2007a) realizaram a identificação e quantificação de fentião e seus metabolitos em azeitonas e azeites num olival, onde o tratamento foi realizado de acordo com a dose recomendada. Todas as amostras colhidas, ao longo do intervalo de pré-colheita, tinham um padrão qualitativo comum, mostrando quatro substâncias identificáveis (fentião, sulfóxido de fentião, fenoxão e sulfóxido de fenoxão). O fentião e 3 metabolitos foram ainda encontrados nas azeitonas aquando da colheita. Os mesmos autores estudaram a presença de metabolitos de fosmete em azeitonas obtidas em

condições semelhantes ao descrito para o fentião. Além do fosmete, foram detetados fosmete-oxão, ftalamida, N- hidroximetilftalamida e ácido ftálico em azeitonas e azeite (Cunha et al. 2007b) .

### Conclusões

Estudos realizados na determinação de resíduos de pesticidas em azeites mostram que existe um claro aumento na concentração de resíduos de pesticidas lipofílicos face às azeitonas que estão na sua origem. Na prática, são diversos os fatores que contribuem para a dissipação ou concentração de um pesticida após a sua aplicação no olival, passando pela natureza da molécula ativa, as condições de aplicação, o intervalo de tempo decorrido entre o último tratamento e a apanha do fruto, as condições ambientais, o tipo de armazenamento, de transporte e de processamento efetuado. Na maioria dos estudos realizados em azeites verifica-se que os LMR de pesticidas não foram ultrapassados pelo que a exposição humana a resíduos de pesticidas provenientes do consumo de azeite é muito baixa.

### Referências bibliográficas

- Amvrazi E.G., Albanis T.A. (2009). Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry* 113, 253-261.
- Ballesteros E., García Sánchez A., Ramos Martos N. (2006). Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr A*. 1111, 89 -96.
- Botitsi E., Kormali P., Kontou S., Mourkojanni A., Stavrakaki E., Tsipti D. (2004). Monitoring of pesticide residues in olive oil samples: Results and remarks between 1999 and 2002, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84, 231-239.
- Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Karim M., Minelli E.V. (1997). Persistence of insecticide residues in olives and olive oil, *J. Agric. Food Chem.* 45, 2244-2247.
- Cunha S.C. (2007). Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. 1-394.
- Cunha S.C., Lehotay S.J., Mastovska K., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., Sample preparation approaches for the analysis of pesticide residues in olives and olive oils at the book *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Editors Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson, Oxford: Academic Press, 2010, pp. 653-666.

Cunha S.C., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P. (2007a). Comparison of matrix-solid phase dispersion and liquid-liquid extraction for the chromatographic determination of fenthion and its metabolites in olives and olive oils. *Food Add. Cont.* 24, 156-164.

Cunha S.C., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P. (2007b). Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas-chromatography mass spectrometry. *Talanta* 73, 514-522.

Diretiva 2009/127/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009, que altera a Diretiva 2006/42/CE no que respeita às máquinas de aplicação de pesticidas.

Directiva 2009/128/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro, que institui um quadro de ação a nível comunitário para uma utilização sustentável dos pesticidas.

EFSA, The 2011 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* 2014;12(5):3694 [511 pp.]. (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3694.htm> acedido em maio de 2014)

Farris G.A., Cabras P., Spanedda L. (1992). Pesticide residues in food processing, *Ital. J. Food Sci.* 3, 149-169.

Ferrer C., Gomez M.J., Garcia-Reyes J.F., Ferrer I., Thurman E.M., Fernandez-Alba R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1069, 183-194.

Gilden R.C., Huffling K., Sattler B. (2010). Pesticides and Health Risks. *JOGNN*, 39, 103-110.

Guardia-Rubio M., Fernández-De Córdoba M.L., Ayora-Cañada M.J., Ruiz-Medina A. (2006). Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 1108, 231-239.

Holland J., Sinclair P. (2004). Environmental fate of pesticides and the consequences for residues in food and drinking water, in: *Pesticide Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks*, Hamilton D. & Crossley S. (Ed.), John Wiley & Sons LTD, 27-62.

Lentza-Rizos Ch., Avramides E.J., Visi, E. (2001). Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr. A* 921, 297-304.

Likudis Z., Costarelli V., Vitoratos A., Apostolopoulos C. (2014). Determination of pesticide residues in olive oils with protected geographical indication or designation of origin. *Int. J. Food Science & Technology* 49, 484-492.

Keikotlhaile B.M., Spanoghe P. (2011). Pesticide Residues in Fruits and Vegetables in *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, book edited by Margarita Stoytcheva, ISBN 978-953-307-532-7, CC BY-NC-SA 3.0, 243-252.

Regulamento (CE) N.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009, relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado e que revoga as Diretivas 79/117/CEE e 91/414/CEE do Conselho.

Regulamento (CE) N.º 1185/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Novembro de 2009 relativo às estatísticas sobre pesticidas.

Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005, relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal, e que altera a Diretiva 91/414/CEE do Conselho.

Sánchez A.G., Martos N.R., Ballesteros E. (2006). Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass-spectrometric determination, *Anal. Chim. Acta* 558, 53-61.

Tomlin, C.D.S. (2003). *The Pesticide Manual*, 14th edition, British Crop Protection Council, Surrey, UK.

Tsatsakis A.M., Tsakiris I.N., Tzatzarakis M.N., Agourakis Z.B., Tudaki M., Alegakis A.K. (2003). Three-year study of fenthion and dimethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation, *Food Add. Cont.* 20, 553-559.

## Possíveis contaminantes de óleos de fritura

**Tânia Gonçalves Albuquerque<sup>a,b</sup>, Helena S. Costa<sup>a,b</sup>, Ana Sanches-Silva<sup>a,c</sup>, M. Beatriz P.P. Oliveira<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.

<sup>b</sup> REQUIMTE/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, Porto

<sup>c</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto

### Introdução

O aumento do consumo de alimentos fritos e pré-fritos implica uma maior ingestão de óleos e gorduras. Tal comportamento tem sido influenciado por razões sociais e económicas, pois a população dispõe de menos tempo para a preparação dos seus alimentos.

Uma ingestão adequada de lípidos é crucial para um desenvolvimento saudável. Para além do seu contributo energético, deve ter-se em consideração a importância da sua ingestão para obter os ácidos gordos essenciais e as vitaminas lipossolúveis requeridos diariamente. A ingestão diária recomendada varia em função da idade, do estado de saúde do indivíduo e do estilo de vida. A ingestão de gordura em excesso tem sido relacionada com o aumento do risco de obesidade, doença coronária e certos tipos de cancro. Os mecanismos pelos quais estas doenças se desenvolvem são complexos, variados e em muitos casos não estão ainda totalmente esclarecidos.

Os óleos e gorduras são, geralmente, submetidos a processamento/refinação, segundo protocolos adequados, para melhorar a sua qualidade, estabilidade e segurança. No entanto, muitas vezes o processamento a que são submetidos, apesar de remover uma grande quantidade de impurezas do óleo e substâncias indesejáveis, pode originar contaminantes, constituindo perigos acrescidos para a saúde de quem os consome.

O processo de fritura é uma alternativa de preparação de alimentos rápida, ao mesmo tempo que confere características sensoriais diferenciadas. O crescimento das indústrias que produzem estes alimentos desencadeou o desenvolvimento de novos equipamentos, tanto industriais como domésticos, nos quais uma determinada quantidade de óleo é submetida a aquecimento por longos períodos de tempo [1]. No processo de fritura, o alimento é submerso em óleo/gordura a 180 °C, o qual funciona como meio de transferência de calor. Esta forma de aquecimento é mais eficiente do que a cozedura a vapor ou em água, já que as temperaturas

alcançadas pelo processo de fritura são superiores. Considerando que parte do óleo é absorvido pelo alimento, tornando-se assim parte da alimentação, o meio de fritura deve manter a qualidade adequada ao longo de todo o processo.

Durante o aquecimento do óleo, ocorre uma série complexa de reações que leva à sua degradação e à formação de numerosos compostos. As qualidades funcionais, sensoriais e nutricionais modificam-se de tal forma que, passado algum tempo, não é possível continuar a produzir alimentos com qualidade.

### O processo de fritura e a degradação dos óleos

As principais formas de degradação do óleo envolvem a hidrólise, a oxidação, a isomerização e a polimerização, resultando na formação de ácidos gordos livres, aldeídos, cetonas, diglicéridos e monoglicéridos, isómeros *trans*, entre outros compostos [2]. Para evitar a autooxidação de óleos e gorduras é fundamental diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo os níveis mínimos de energia (temperatura e luz) responsáveis pela formação de radicais livres, reduzir a vestígios os metais no óleo, evitar ao máximo o contacto com o oxigénio, e evitar a formação de radicais livres com a adição de antioxidantes [3].

Para minimizar essa degradação são aconselhados óleos e gorduras mais estáveis, entre os quais se destacam o óleo de palma. São também utilizados óleos vegetais hidrogenados com baixos teores de ácidos gordos polinsaturados (AGPI). Em consequência do referido podem surgir óleos com elevadas quantidades de ácidos gordos saturados (AGS) e/ou ácidos gordos *trans* (AGT) os quais podem ser absorvidos pelos produtos fritos.

Estão disponíveis, atualmente, óleos de elevada estabilidade, obtidos por modificação genética de sementes oleaginosas, com baixos teores de AGPI, com elevados teores de ácido oleico, ou seja, com composição em ácidos gordos e triglicéridos muito diferente dos óleos convencionais [4].

Dos produtos tóxicos formados ao longo do processo de fritura, o 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) e o 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal (HNE) levantam alguns problemas de segurança, sendo aconselhados mais estudos para esclarecer a sua formação, os teores formados e as implicações de saúde para os consumidores.

### Ácidos gordos *trans*

Os AGT foram definidos por várias entidades [5,6] nomeadamente, o *Codex Alimentarius* como “todos os isómeros de ácidos gordos mono e polinsaturados com ligações duplas carbono-carbono na configuração *trans*, interrompidas pelo menos por um grupo metileno”. A European Food Safety Authority (EFSA) defende que os AGT polinsaturados “têm pelo menos uma ligação dupla *trans*, mas podem também ter ligações duplas de configuração *cis*”.

A determinação analítica dos teores de AGT em géneros alimentícios é frequentemente um grande desafio. Ao longo dos anos têm sido divulgadas diversas técnicas analíticas para a sua determinação, sendo as mais comuns a cromatografia gasosa (CG), seguida pela cromatografia líquida de fase reversa (HPLC). Na CG são utilizados diversos tipos de detetores, tais como o detetor de ionização de chama (FID) ou o detetor de espectrometria de massa (MS), permitindo este último uma melhor identificação dos picos cromatográficos. Permite ainda comparar o tempo de retenção com padrões puros e comparar a informação obtida com a biblioteca de espetros.

Os ácidos gordos de forma geral apresentam elevada polaridade e baixa volatilidade, pelo que a derivatização em ésteres metílicos é essencial para a sua análise [7]. Relativamente às colunas cromatográficas para a análise de AGT, as mais comuns são as colunas capilares de sílica fundida de 100 m de comprimento, uma vez que evitam a sobreposição dos isómeros dos AGT [8].

Existem três fontes principais de AGT nos alimentos. A primeira é a hidrogenação parcial, que converte os óleos vegetais líquidos em gorduras sólidas ou semi-sólidas, com propriedades adequadas, por exemplo, para a produção de margarinas. A segunda é a presença natural deste tipo de ácidos gordos, em gordura de animais ruminantes, formadas no seu estômago por hidrogenação microbiana de ácidos gordos insaturados com configuração *cis*. Por último, o tratamento térmico a elevadas temperaturas pode levar ao aparecimento deste tipo de ácidos gordos nos alimentos [9].

O papel das gorduras e/ou óleos na nutrição humana tem sido uma área de grandes controvérsias e alvo de inúmeros estudos científicos. A gordura em excesso é considerada um dos “piores” nutrientes, atuando como promotor de inúmeras doenças, nomeadamente, as cardiovasculares (DCV), diabetes, obesidade e certos tipos de cancro. Os AGT foram associados a um efeito indesejável no perfil lipídico sérico, com aumento do risco de DCV [10]. De acordo com a literatura, as consequências para a saúde, associadas ao seu consumo, foi considerada ainda mais nefasta do que o consumo de ácidos gordos saturados. Uma ingestão diária de 5 g de AGT foi associada a um aumento de 25% do risco de desenvolvimento de doença coronária [11].

Inúmeros estudos têm sido conduzidos em diversos países para determinar os teores de AGT em alimentos industriais, confeitarias e cadeias de “fast-food”, com o objetivo de avaliar as diversas fontes alimentares e estimar a ingestão diária dos AGT. Segundo Larqué et al. (2001), os alimentos que contêm gordura parcialmente hidrogenada contribuem com cerca de 80% a 90% da ingestão diária em AGT [12]. Para alimentos provenientes de ruminantes esta contribuição é bem menor, sendo estimada entre 2% a 8%. Os óleos refinados apresentam níveis razoavelmente baixos (1,0 - 1,5%) de AGT, mas a neutralização, principalmente na preparação de alimentos fritos, pode tornar significativa a sua contribuição na ingestão diária de AGT [13]. Contudo, os AGT são também produzidos durante a preparação de margarinas, quando os AGPI nos óleos líquidos são artificialmente hidrogenados para preparar gorduras sólidas. Quantidades significativas de AGT são encontradas nas margarinas, alguns tipos de manteigas e outros produtos industrializados que contenham gorduras hidrogenadas [14].

Em Portugal, a determinação dos teores de AGT presentes nos óleos/gorduras destinados à alimentação, tem sido durante os últimos anos pouco estudada. No entanto, durante os anos 90, foram realizados diversos estudos por grupos de investigadores portugueses no que diz respeito aos teores de AGT em diversos tipos de alimentos. A **Tabela 1** resume alguns dos resultados publicados para margarinas, óleos e manteigas.

Além de terem sido determinados os teores em óleos/gorduras crus, também foram realizados estudos em que foi avaliada a composição em ácidos gordos dos óleos submetidos a frituras contínuas [16]. Neste trabalho de investigação, foram conduzidos ensaios de fritura em estufa até às 96 h

(utilizando só o óleo), para se avaliar a formação de AGT nos óleos/gorduras vulgarmente utilizados no processo de fritura. Para além disso também foi determinado, entre outros parâmetros, o perfil em ácidos gordos dos óleos utilizados na fritura de três tipos de alimentos: batatas fritas, filetes de polvo e rissóis de carne, e a composição em ácidos gordos dos alimentos fritos. Concluiu-se que a presença de AGT é dependente da natureza dos óleos, isto é, o óleo de soja apresentou os maiores teores, quando comparado com o óleo alimentar, que foi aquele que apresentou a maior estabilidade à fritura. Para além disso, também se verificou que a composição em ácidos gordos e isómeros *trans* do banho de fritura apresenta-se como um fator determinante na composição final da gordura do produto frito [16].

**Tabela 1.** Teores de ésteres metílicos de AGT (g/100 g de gordura) em margarinas, minarinas, óleos, “shortenings” e manteigas.

Alimentos	AGT <sup>a</sup> (g/100 g de gordura)
Margarinas de mesa	0,23 – 14,8
Margarinas de cozinha	0,95 – 13,1
Margarinas de uso industrial	3,15 – 12,9
“Shortenings”	0,07 – 16,9
Minarina	0,16
Gordura líquida para culinária	0,13
Manteiga	4,62 – 5,26
Óleos vegetais	0,13 – 1,55
Óleos alimentares	0,14 – 0,25

Adaptado de [15]

<sup>a</sup> Os valores são apresentados em g de ésteres metílicos de ácidos gordos por 100 g de gordura.

### 3-Monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD)

O 3-MCPD é um contaminante resultante do processamento alimentar que pertence ao grupo dos cloropropanóis. Trata-se de contaminantes químicos derivados do glicerol, caracterizados estruturalmente por álcoois e dióis de três carbonos ligados a um ou dois átomos de cloro. De acordo com a literatura científica, verifica-se que o 3-MCPD é aquele que se encontra em maior abundância nos alimentos, seguido pelo 2-monocloropropano-1,2-diol (2-MCPD).

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento do número de estudos relacionados com o desenvolvimento de

métodos analíticos para determinação dos teores de 3-MCPD em géneros alimentícios, como demonstrado pela revisão científica recente de Crews e seus colaboradores (2013) [17]. A análise destes contaminantes é extremamente complexa e identificam-se sobretudo métodos diretos e métodos indiretos. Os métodos diretos permitem a identificação individual dos ésteres do 3-MCPD. Geralmente estes métodos são precedidos de extração em fase sólida e a determinação do 3-MCPD é posteriormente realizada utilizando métodos de CG sobretudo acoplada a detetor MS [18]. No entanto, nos últimos tempos também têm sido divulgados métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), utilizando detetores como “time of flight” (TOF), “orbitrap” e triplo quadrupolo (MS/MS) [19]. Por sua vez nos métodos indiretos, a concentração total dos ésteres de 3-MCPD é medida como 3-MCPD livre e inclui, a maior parte das vezes, adição de padrão interno, hidrólise, neutralização, remoção dos ésteres metílicos de ácidos gordos, derivatização do 3-MCPD, e por último análise por CG/MS.

A “International Agency for Research on Cancer” classificou o 3-MCPD como possível carcinogénico em humanos (grupo 2B) [20]. Existem na literatura científica poucos estudos e muitos deles são controversos no que diz respeito aos efeitos deste contaminante na saúde humana. No entanto, em 2001, o “Scientific Committee on Food” concluiu que o 3-MCPD é um carcinogénico não genotóxico e estabeleceu como dose diária admissível 2 µg/kg de peso corporal [21]. A Comissão das Comunidades Europeias estabeleceu teores máximos de 20 µg/kg (para o produto líquido contendo 40% de matéria seca, correspondente a um teor máximo de 50 µg/kg na matéria seca) para a ocorrência de 3-MCPD em proteínas vegetais hidrolisadas e molho de soja [22].

No início dos anos 80, a presença de 3-MCPD foi detetada em hidrolisados de proteína vegetal, em molho de soja e produtos similares, que se formava como um produto da reação do ácido clorídrico com os triacilgliceróis, os fosfolípidos e o glicerol presentes nos óleos vegetais residuais [23]. Posteriormente, verificou-se que o 3-MCPD também pode estar presente em outros produtos que são processados termicamente, como por exemplo, produtos de pastelaria, produtos derivados do malte, produtos fumados e/ou curados à base de peixe ou carne. Em 2006, foi publicado por Zelinkova et al. o primeiro estudo relativo à presença de ésteres de 3-MCPD em óleos e gorduras [24]. Em Portugal, a



informação relativa ao teor deste contaminante em géneros alimentícios é ainda muito limitada ou quase inexistente. Na **Tabela 2**, apresentam-se alguns resultados relativos aos teores de 3-MCPD em óleos e gorduras.

**Tabela 2.** Teores de 3-MCPD ( $\mu\text{g/kg}$ ) em óleos e gorduras.

Alimento	Gama ( $\mu\text{g/kg}$ )	Referência
Azeites refinados	<300 – 2462	[24]
Banha de porco, gordura do leite, gordura de aves	<100 – 300	[25]
Margarina	400 – 4500	[25]
Óleos de fritura (frescos e usados)	500 – 5200	[25]
Óleos vegetais refinados	<300 – 1234	[24]
Óleos vegetais refinados	150 – 1880	[25]
Óleo de girassol refinado	100 – 2100	[26]
Óleo de salmão refinado	700 – 13000	[26]
Óleo de palma refinado	1100 – 10000	[26]

A quantificação dos teores destes compostos em óleos e gorduras é particularmente importante no que diz respeito à saúde humana, uma vez que muitas vezes para além de podermos ingerir os óleos/gorduras que contém teores de 3-MCPD muito consideráveis, estes mesmos óleos/gorduras são muitas vezes ingredientes dos alimentos processados. Por exemplo, o óleo de palma é vulgarmente utilizado para a preparação de alimentos destinados a bebés, produtos de pastelaria, maionese, entre outros. Nos últimos anos, tem-se assistido a progressos significativos no que diz respeito ao desenvolvimento de métodos analíticos para doseamento do 3-MCPD, estudos reativos aos principais mecanismos de formação deste contaminante em géneros alimentícios, identificação de novas fontes alimentares, avaliação do seu potencial tóxico e desenvolvimento de técnicas de processamento que minimizem a formação do 3-MCPD e outros clopropanóis.

#### 4-Hidroxi-2-trans-nonenal

O HNE é um produto secundário da peroxidação lipídica do ácido linoleico e de outros ácidos gordos ómega-6 [27, 28]. É um composto tóxico relacionado com o desenvolvimento de aterosclerose, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Huntington) entre outras [29-31].

Estes aldeídos formam-se como consequência da oxidação dos ácidos gordos em presença de oxigénio. Quando os óleos vegetais, sobretudo os que são ricos em ácidos gordos polinsaturados, são submetidos a elevadas temperaturas, por exemplo como acontece na fritura, aumenta o risco de formação de produtos secundários como o HNE. Uma vez que o HNE é um composto de elevada toxicidade, que é absorvido a partir da alimentação, e que está relacionado com inúmeras doenças, a informação no que se refere aos mecanismos de formação deste composto, sobretudo em óleos e gorduras submetidos a elevadas temperaturas, é muito importante do ponto de vista da saúde pública.

A determinação analítica de HNE é sobretudo realizada com recurso a técnicas de LC-MS ou CG-MS [32]. A análise por GC-MS requer a derivatização da amostra, por exemplo utilizando pentafluorobenzilo, seguida por sililação, e o HNE derivatizado pode ser detetado com ionização química negativa e quantificado por comparação com o padrão interno (HNE deuterado) [33, 34]. As técnicas de análise por LC-MS têm a vantagem de não ser necessária a derivatização, sendo possível a análise com muito menos passos intermédios de extração [35, 36].

Boskou et al. (2006) reportou resultados para óleos (girassol, palma, azeite e gordura vegetal) usados na fritura de batatas, bem como para o produto frito, e verificou que o teor de HNE está sobretudo relacionado com o tipo de óleo usado na fritura, e não tanto com a deterioração térmica a que o óleo é sujeito [38]. Em 2008, Han and Csallany (2008) compararam óleos vegetais e manteiga, submetidos a elevadas temperaturas durante curtos períodos de tempo, com óleos vegetais e manteiga submetidos a temperaturas mais baixas, mas durante períodos de tempo mais longos. Deste modo, verificaram que mais uma vez era mais importante a composição em ácidos gordos dos óleos vegetais, do que o próprio tempo de exposição ao tratamento térmico, concluindo que para óleos/gorduras que contém elevados teores de ácido linoleico o tratamento térmico deve ser realizado utilizando temperaturas baixas, para prevenir a formação do HNE.

Estudos científicos evidenciam que o HNE pode estar presente em outros alimentos para além de óleos e gorduras de origem vegetal, como por exemplo em fiambre, bacon, e salsichas fumadas, com teores a variar entre 3,77 e 95,2  $\mu\text{mol/kg}$  [39]. Han and Csallany (2012), determinaram

teores de HNE em queijos “Mozzarella” naturais e imitações de queijos “Mozzarella”, que foram expostos a várias temperaturas e diferentes tempos de aquecimento [40]. De acordo com os resultados obtidos, verificaram que a formação de HNE era significativamente menor nos queijos de “Mozzarella” naturais, que contém gordura do leite, quando comparados com as imitações de queijo “Mozzarella” em que sobretudo são utilizados óleos vegetais (ricos em ácido linoleico) [40].

Neste sentido, dado que o HNE é um composto tóxico associado a efeitos negativos na saúde humana, são necessários mais trabalhos de investigação científica que incidam sobre a determinação do teor deste composto em outros alimentos, e que estudem alterações de processamento que possam conduzir à diminuição da sua formação.

### Agradecimentos

Tânia Gonçalves Albuquerque agradece a Bolsa de Investigação Científica Ricardo Jorge (BRJ/DAN-2012) financiada pelo INSA, I.P. Este trabalho foi financiado pelo INSA no âmbito do projeto “PTranSALT - Avaliação de ácidos gordos *trans*, gordura saturada e sal em alimentos processados: estudo do panorama português (2012DAN828)”.

This work received financial support from the European Union (FEDER funds through COMPETE) and National Funds (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) through project Pest-C/EQB/LA0006/2013.

### Referências

- [1] Dobarganes MC, Pérez-Camino MC. Frying process: selection of fats and quality control. *Int M Fats Oils Tech Symp and Ex* 1991; 49:58-66.
- [2] Choe E, Min DB. Chemistry of deep-fat frying oils. *J Food Sci* 2007; 72:77-86.
- [3] Ramalho V, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quím Nova* 2006; 29:755-760.
- [4] Rattray J. News fats and oils through biotechnology. *Inform.* 1990; 1:945-947.
- [5] Codex Alimentarius. Guidelines on nutrition labelling. CAC/GL2 1985 amendment 4. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta%34](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta%34).
- [6] EFSA (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1461.htm>.
- [7] Ruiz-Rodriguez J, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *J Pharmaceut Biomed* 2010; 51:305-326.
- [8] Albuquerque TG, Costa HS, Castilho MC, Sanches-Silva A. Trends in the analytical methods for the determination of trans fatty acids content in foods. *Trends Food Sci Tech* 2011; 22:543-560.
- [9] Richter EK, Shawish KA, Scheeder MR, & Colombani PC. *Trans* fatty acid content of selected Swiss foods: the TransSwiss Pilot study. *J Food Comp Anal*, 2009; 22: 479-484.
- [10] Mozaffarian D, Aro A, Willett W. Health effects of trans fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63:S1-S4.
- [11] Stender S, Dyerberg J, Astrup A. Consumer protection through a legislative ban on industrially produced trans fatty acids in foods in Denmark. *Scand J Food Nutr* 2006; 50: 155-160.
- [12] Larque E, Zamora S, Gil A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev* 2001; 65:315-415.
- [13] Aro A, Van ABW, Van EBMA, Kafatos A, Leth T, Poppel G. Trans fatty acids in dietary fats and oils from 14 European Countries: the TRANSFAIR study. *J. Food Comp Anal* 1998; 11:137-149.
- [14] Garrow JS, James WPT, Ralph A. *Human Nutrition and Dietetics*. 10<sup>th</sup> edition. Churchill Livingstone.
- [15] Amaral ECC, Cruz JA, Martins I, Ramos M, Camacho MA, Remígio J. Ácidos gordos *trans* nos alimentos portugueses. *Rev Port Nutr* 1998; 3:5-18.
- [16] Oliveira MBPP. Estudo de qualidade de lípidos alimentares. Toxicidade e avaliação dos teores de isómeros *trans* dos ácidos gordos insaturados. 1994. Disponível em: [file:///C:/Users/HSC/Downloads/187\\_TD\\_01\\_P%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HSC/Downloads/187_TD_01_P%20(1).pdf)
- [17] Crews C, Chiodini A, Granvogl M, Hamlet C, Hrnčířík K, Khulmann J, Lampen A, Scholz G, Weisshaar R, Wenzl T, Jasti PR, Seefelder W. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. *Food Addit Contam A* 2013; 30:11-45.
- [18] Weißhaar R. Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110:183-186.
- [19] Masukawa Y, Shiro H, Nakamura S, Kondo N. A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils. *J Oleo Sci* 2010; 2:81-88.
- [20] IARC (International Agency for Research on Cancer). 3-Monochloro-1,2-propanediol. In: *IARC Monographs Volume 101. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water*. Lyon, France, 2012, 349-374.
- [21] SCF (Scientific Committee on Food), 2001. Opinion of the scientific committee on food on 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD). Updating the SCF opinion of 1994. Adopted on 30

- May 2001. Brussels, Belgium: European Commission. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out91\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out91_en.pdf)
- [22] Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JOUE L364; 5-24.
- [23] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report of EFSA. Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. EFSA Journal 2013; 11(9):3381. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3381.pdf>.
- [24] Zelinková Z, Svejková B, Velišek J, Doležal M. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. Food Addit Contam 2006; 23:1290-1298.
- [25] Weißaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. Eur J Lipid Sci Technol 2011; 113:304-308.
- [26] Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. Eur J Lipid Sci Technol 2011; 335-344.
- [27] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, monaldehydes and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991; 11:81-128
- [28] Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products. Am J Clin Nutr 1993; 57:779S-786S.
- [29] Grootveld M, Atherton MD, Sheerin NA, Hawkes J, Blake D, Richens TE, Silwood CJL, Lynch E, Claxson AWD. In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of unsaturated aldehydes in experimental animals. Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. J Clin Invest 1998; 101:1210-1218.
- [30] Kritchevsky D. Dietary fat and experimental atherosclerosis. Int J Tissue React 1991; 13:59-65.
- [31] Owen AD, Schapira HA, Jenner P, Marsden CD. Indices of oxidative stress in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. J Neural Transm Suppl 1997; 51:167-173.
- [32] Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. Redox Biol 2013; 1:145-152.
- [33] Selley ML. Determination of lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal in clinical samples by gas chromatography negative-ion chemical ionisation mass spectrometry of the O-pentafluorobenzyl oxime. J Chrom B 1997; 691:263-268.
- [34] van Kuijk FJGM, Siakotos NA, Fong LG, Stephens RJ, Thomas DW. Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low-density-lipoprotein by gas-chromatography mass-spectrometry. Anal Biochem 1995; 224:420-424.
- [35] Gioacchini AM, Calonghi N, Boga C, Cappadone C, Masotti L, Roda A, Traldi P. Determination of 4-hydroxy-2-nonenal at cellular levels by means of electrospray mass spectrometry. Rapid Commun Mass Sp 1999; 13:1573-1579.
- [36] Zanardi E, Jagersma CG, Ghidini S, Chizzolini R. Solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the evaluation of 4-hydroxy-2-nonenal in pork products. J Agr Food Chem 2002; 50:5268-5272.
- [37] Boskou G, Salta FN, Chiou A, Troulidou E, Andrikopoulos NK. Content of trans,trans-2,4-decadienal in deep-fried and pan-fried potatoes. Eur J Lipid Sci Technol 2006; 108:109-115.
- [38] Han IH, Csallany AS. Temperature dependence of HNE formation in vegetable oils and butter oil. J Am Oil Chem Soc 2008; 85:777-782.
- [39] Munasinghe DMS, Ichimaru K, Matsui T, Sugamoto K, Sakai T. Lipid peroxidation-derived cytotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal in smoked pork. Meat Sci 2003; 63:377-380.
- [40] Han IH, Csallany AS. The toxic aldehyde, 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) formation in natural and imitation Mozzarella cheeses: heat treatment effects. J Am Oil Chem Soc 2012; 89:1801-1805.

## Marcadores de ADN para a autenticação de azeites

**Joana Costa, Isabel Mafra, M. Beatriz P. P. Oliveira**

REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal (E-mail: [beatoliv@ff.up.pt](mailto:beatoliv@ff.up.pt))

### Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma cultura mediterrânica tradicional, perene, responsável pela produção de azeite e azeitona de mesa. O azeite é o sumo da azeitona, separado da polpa exclusivamente por processos mecânicos. Esta gordura vegetal é considerada única entre os óleos vegetais, pois é consumida crua, preservando as suas propriedades nutricionais, bem como o seu teor em vitaminas e compostos fenólicos [1].

Ao longo das últimas décadas e especialmente nos últimos anos, o azeite tem ocupado uma posição muito relevante na dieta humana. É muito apreciado a nível mundial, estando este produto intrinsecamente relacionado com a típica dieta mediterrânica. Esta é considerada a dieta mais equilibrada, tendo sido definida como um modelo de alimentação saudável, por estar associada a um menor risco de mortalidade devido a doenças cardiovasculares, cancro, doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, bem como outras disfunções metabólicas. O azeite é um ingrediente fundamental na dieta mediterrânica, constituindo a principal fonte de gordura. O seu consumo está relacionado com inúmeros benefícios para a saúde, dos quais se destacam a melhoria do perfil lipídico, diminuição da resistência à insulina e da inflamação periférica, melhoria nos processos de stress oxidativo e da função endotelial, entre outros (ver revisão [2]). Além de todos os potenciais benefícios para a saúde e do seu elevado valor nutricional, esta gordura também é muito apreciada pelo seu sabor e aroma muito particulares.

Atualmente, por causa das recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA), da *American Heart Association*, da Sociedade Europeia de Cardiologia e de outras organizações científicas, para a inclusão do azeite noutras dietas que não a Mediterrânica, a demanda por este produto de elevada qualidade tem vindo a aumentar. Como prova deste facto, a produção mundial de azeite registou um crescimento de mais de 30% ao longo dos últimos 15 anos. Por ser tão característico da alimentação mediterrânica, quase 72% da produção mundial de azeite provém dos países do sul da

Europa. Em 2012, a Espanha foi o maior produtor de azeite, sendo seguido pela Itália e pela Grécia, que em conjunto asseguraram mais de 69% da produção mundial de azeite. A nível mundial e dentro da União Europeia (UE), Portugal ocupa respetivamente as oitava e quarta posições, tendo em 2012 contribuído com cerca de 2,4 % da produção total de azeite. Segundo os últimos dados da FAOSTAT (divisão de estatística da *Food and Agriculture Organization*) para 2011, o azeite foi a terceira cultura mais importante em termos de comércio global de gorduras vegetais, ficando apenas atrás da soja e colza [3].

O azeite é considerado um produto com elevada importância económica, sendo por isso um alvo suscetível a práticas de produção/comercialização fraudulentas. O azeite pode ser produzido a partir de diferentes variedades ou cultivares de azeitonas, sendo estas responsáveis pela sua composição química distinta e pelas características sensoriais. A UE estabeleceu legislação específica para o azeite, de forma a proteger os consumidores de potenciais fraudes e os produtores de azeite da concorrência desleal. Atualmente existem vários instrumentos de denominação, tais como a Denominação de Origem Protegida (DOP) (Regulamento (CE) 510/2006), que são usados na rotulagem do azeite. A prática de adulteração mais comum consiste na adição de óleos vegetais provenientes de outras espécies, podendo representar um problema de saúde pública para indivíduos alérgicos.

Para verificar o cumprimento da rotulagem, garantir a qualidade/autenticidade do azeite e assegurar a proteção da saúde do consumidor, é essencial o desenvolvimento de métodos de análise com elevada sensibilidade e especificidade. No caso da avaliação da qualidade e autenticidade do azeite, os métodos químicos e os baseados na deteção de ADN têm sido amplamente explorados. Considerando os tópicos aqui expostos, nesta revisão serão focados os temas mais relevantes relacionados com a análise de azeite através de técnicas baseadas no ADN.

### Métodos de extração do ADN de azeite

As análises químicas, tais como o perfil em ácidos gordos e esteróis, fenóis e/ou metabolitos secundários não permitem a identificação exata das variedades usadas para a produção de um dado azeite, devido ao efeitos das condições ambientais sobre o fenótipo e, em particular, sobre a composição química de azeitonas. Neste sentido, a análise de ADN pode contribuir para a definição de perfis genéticos que permitam uma identificação inequívoca de cada variedade de azeitona. No entanto, a aplicação de qualquer método molecular tem como uma das principais limitações a obtenção de extratos de ADN com qualidade/quantidade e pureza adequadas, pelo que a maioria dos trabalhos de pesquisa tem dedicado especial atenção aos protocolos de extração de ADN (ver revisão [4]).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente dependente de um passo crítico inicial que corresponde à extração e purificação do ADN. Em matrizes alimentares complexas e altamente processadas, tal como é o caso do azeite e de outros óleos vegetais, a fase de extração e purificação do ADN é ainda mais determinante, para garantir a qualidade dos extratos e a remoção de potenciais inibidores da PCR. Substâncias como polissacarídeos, compostos fenólicos e outros componentes podem não ser totalmente removidos com os protocolos de extração clássicos, permanecendo como contaminantes nos extratos de ADN. Como consequência, a amplificação de ADN pode ser drasticamente afetada ou mesmo completamente inibida pela presença destes inibidores. Por ser uma matriz lipídica, a extração de ADN de azeite é uma tarefa difícil, especialmente por este estar presente em pequena quantidade e a sua integridade ter sido afetada por enzimas como as endonucleases. No entanto, vários métodos têm sido reportados como adequados para a obtenção de ADN amplificável, a partir de azeite. O protocolo baseado no CTAB clássico (brometo de cetiltrimetilamónio), com ou sem modificações, é um dos métodos mais usados para a extração de ADN de azeite. Outros protocolos, nomeadamente vários kits comerciais têm sido também aplicados com sucesso na extração de ADN desta matriz. Destacam-se o *Wizard Magnetic purification system for food* (Promega, Madison, WI, EUA) testado em diferentes óleos vegetais (incluindo azeite), os kits *NucleoSpin* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) usados em azeites monovarietais e o *QIAamp DNA Stool kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) aplicado a azeites filtrados, descritos como os mais

adequados para a extração de ADN amplificável a partir de matrizes lipídicas (óleos vegetais e azeite) (ver revisão [4]).

Além do método de extração, a quantidade inicial utilizada na extração de ADN de azeites ou outros óleos vegetais é também considerada um passo crítico. No caso dos azeites, têm sido usadas diversas quantidades iniciais, desde poucos microlitros até 500g. Uma vez que o azeite é obtido por processos mecânicos e comumente não sujeito a refinação, este produto é consumido na sua forma crua, ao contrário de outros óleos vegetais tal como já referido [1]. Neste contexto, a utilização de pequenas quantidades iniciais de azeite e um protocolo de extração de ADN eficiente, podem permitir a obtenção de extratos com a quantidade, integridade e pureza adequadas para a sua posterior análise por métodos baseados na PCR. Adicionalmente, para a aplicação efetiva destas metodologias, recomenda-se a amplificação de regiões com pequeno tamanho (aproximadamente 100-200 pares de bases), uma vez que o ADN presente pode estar bastante fragmentado.

Outra questão de grande importância prende-se com o período de armazenamento do azeite. De acordo com a literatura, para a boa rastreabilidade do azeite, a amostra deve ser tão fresca quanto possível para garantir uma elevada repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados, uma vez que o ADN pode sofrer processos de oxidação e ação enzimática durante os longos períodos de armazenamento [5].

### Adulteração de azeite com óleos de diferentes espécies vegetais

O azeite é um produto com grande probabilidade de ser alvo de práticas fraudulentas, dado o seu valor comercial, comparativamente com outros óleos vegetais. Têm sido identificados vários adulterantes em azeites virgens, desde azeite refinado, azeite virgem desodorizado, óleo de bagaço de azeitona e misturas de óleos de sementes (por exemplo: milho, algodão, avelã, colza e girassol). Tradicionalmente, a mistura de azeite com óleos vegetais de menor valor económico tem sido um problema dos países produtores de sementes oleaginosas e importadores de azeites (ver revisão [6]).

As características organoléticas do azeite associadas aos efeitos benéficos na saúde têm contribuído para o aumento da sua popularidade e da sua procura nos últimos anos. A avaliação da autenticidade de óleos vegetais como o azeite

pode ser realizada por um conjunto de métodos, variando desde as técnicas físico-químicas clássicas aos métodos cromatográficos mais recentes (gás, líquido, gás-líquido, quiral, de íões de prata, espectrometria de massa e de fluidos supercríticos), às metodologias isotópicas (análise de relação isotópica do carbono, fluorescência de emissão/excitação, pirólise-espectrometria de massa), espectroscópicas (absorção de infravermelho, Raman, ressonância magnética nuclear) (ver revisão [6]) e de base molecular (PCR, *amplified fragment length polymorphism* - AFLP, *random amplified polymorphic DNA* - RAPD, *simple sequence repeats* ou *microsatellites* - SSR, *inter-simple sequence repeats* - ISSR, *single nucleotide polymorphism* - SNP) (ver revisões [4,7]).

As análises cromatográficas e espectroscópicas de diferentes famílias de compostos (ácidos gordos, triacilgliceróis, fitoesteróis, tocoferóis e tocotrienóis, hidrocarbonetos, compostos fenólicos, pigmentos e compostos voláteis) estão entre as abordagens mais utilizadas para a monitorização da qualidade e da autenticidade do azeite (ver revisão [6]). No entanto, a maioria dos métodos químicos disponíveis têm como desvantagens a morosa preparação das amostras. As técnicas alternativas baseadas no ADN têm sido desenvolvidas com sucesso para a identificação de espécies de diferentes óleos vegetais adulterantes do azeite (ver revisões [4,7]). Estas abordagens moleculares têm especial interesse sob o ponto de vista da deteção de óleos vegetais produzidos a partir de matrizes alergénicas, como é o caso da avelã, amendoim, soja entre outros, fraudulentamente incorporados em azeites, representando um risco grave para os indivíduos alérgicos [8,9]. Em relação aos métodos de biologia molecular aplicados à avaliação da autenticidade de azeite, a literatura descreve algumas metodologias baseadas na PCR em tempo real como ferramentas de elevada especificidade e sensibilidade, sendo de rápida e fácil performance para a identificação de óleos vegetais como adulterantes nos azeites [4,7]. Mais recentemente, o uso da PCR em tempo real acoplada a um novo software de análise das curvas de desnaturação do ADN com elevada resolução (*High Resolution Melting*) foi também descrito como uma técnica de elevada performance para a discriminação de diferentes espécies de óleos vegetais (por exemplo de avelã, amendoim e soja) [9].

### **Marcadores de ADN para a identificação de cultivares/variedades de azeitona**

Um outro aspeto importante na avaliação da autenticidade do azeite corresponde à determinação da(s) cultivar(es) das azeitonas. Uma vez que há um número diversificado de cultivares de oliveira, a composição química e as características sensoriais das azeitonas podem apresentar padrões muito distintos. Cultivares geneticamente idênticas, são muitas vezes designadas por nomes diferentes, de acordo com seu local de origem (distintos países ou regiões diferentes dentro de um país), o que torna a sua identificação/classificação numa tarefa árdua. Além disso, a composição química e os descritores sensoriais das cultivares são altamente afetados por aspetos ambientais e agronómicos. Porque algumas cultivares são consideradas de melhor qualidade, certos azeites foram premiados com certificação DOP, o que de acordo com a legislação da UE permite proteger os direitos do consumidor e promover um intercâmbio comercial justo. Para verificar a conformidade da rotulagem sobre a origem das cultivares utilizadas para a produção do azeite, estão disponíveis na literatura vários métodos químicos (ver revisão [6]), embora atualmente os métodos baseados no ADN sejam considerados os mais adequados para resolver as questões associadas com as condições ambientais de crescimento (ver revisão [4]).

Depois de superar a tarefa crítica de extrair ADN amplificável a partir de azeite, foi proposta uma série de marcadores moleculares como SSR ou microssatélites, AFLP, RAPD, ISSR e SNP para verificar a autenticidade dos azeites. Um outro aspeto relevante refere-se ao facto dos azeites serem produzidos a partir de frutos monovarietais ou de diversas cultivares, o que aumenta a complexidade da matriz. Por conseguinte, as técnicas baseadas no ADN têm provado a sua utilidade para distinguir diferentes cultivares. Dos marcadores moleculares disponíveis para a identificação de variedades de azeitona, todos têm vantagens e desvantagens, que são assinaladas na Tabela 1. No entanto, a escolha do melhor marcador de ADN continua a ser uma questão em debate. O SNP parece ser um dos marcadores mais promissores, uma vez que permite distinguir pequenas diferenças entre indivíduos geneticamente semelhantes. Juntamente com o SNP,



os microssatélites (SSR) são provavelmente os marcadores mais utilizados devido ao seu elevado poder de discriminação, embora a sua reprodutibilidade por vezes possa ser

comprometida, pois *alguns fragmentos de ADN, principalmente os de maior tamanho, podem não ser amplificados*.

**Tabela 1** Vantagens/desvantagens dos principais marcadores moleculares para a autenticação de azeites [4].

Vantagens	Desvantagens
<b>SNP</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Fácil performance e possibilidade de combinação com tecnologia de ponta (<i>arrays</i>)</li> <li>✓ Aplicação para determinação do genótipo de cultivares de azeite</li> <li>✓ Detecção de múltiplos SNP na única análise de ADN</li> <li>✓ Capacidade de distinguir pequenas diferenças entre as cultivares de azeite muito semelhantes ou outras espécies de óleos vegetais</li> <li>✓ Aparentemente permite uma alta correlação entre folhas de oliveira e azeite</li> <li>✓ Avaliação da autenticidade de azeites monovarietais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X Requer tecnologia de elevado custo (eletroforese capilar, array LDR-universal, PCR multiplex juntamente com a tecnologia de microarray),</li> <li>χ Mais recentemente aplicado, menos testado em matrizes de azeite,</li> <li>χ Falta de informação sobre a comparação com outros marcadores de um único locus.</li> </ul>
<b>SSR</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Marcadores altamente polimórficos</li> <li>✓ Fácil desempenho e interpretação</li> <li>✓ São os marcadores de ADN mais usados, grande poder discriminatório</li> <li>✓ Identificação de diferentes cultivares de oliveira em azeite</li> <li>✓ Aplicação para avaliar a autenticidade de azeites monovarietais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X Amplificação de fragmentos de ADN de elevado tamanho</li> <li>χ Reprodutibilidade limitada quando aplicados aos azeites devido à baixa integridade do ADN</li> </ul>
<b>AFLP</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Marcadores altamente polimórficos, sem necessidade de conhecimento prévio da sequência do genoma</li> <li>✓ Um dos marcadores multi-locus de ADN mais utilizados para a identificação de cultivares de azeite</li> <li>✓ Possibilidade de conversão de AFLP em marcadores SCAR</li> <li>✓ Avaliação da autenticidade de azeites monovarietais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X Elevada complexidade da técnica</li> <li>χ Díficeis de analisar as inúmeras bandas obtidos, não é adequado para azeites de misturas varietais</li> <li>χ Reprodutibilidade limitada quando aplicados aos azeites devido à baixa integridade do ADN</li> </ul>
<b>PCR</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Identificação de espécies em azeites</li> <li>✓ Detecção de um ou mais fragmentos de ADN</li> <li>✓ Detecção de adulterações em azeites e óleos vegetais</li> <li>✓ Aplicação da técnica de PCR em tempo real como uma potencial ferramenta quantitativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X Extração de ADN é um passo crítico para a sua aplicação em óleos vegetais refinados</li> <li>χ Incapaz de distinguir cultivares</li> </ul>

## Considerações Finais

O interesse crescente do uso de marcadores de ADN para autenticação de alimentos tem contribuído para o desenvolvimento e aplicação de métodos moleculares na análise de alimentos, incluindo o azeite. A atenção dedicada ao desenvolvimento de protocolos de extração de ADN mais eficientes, aplicados ao azeite, conduziu a uma melhoria na recuperação do ADN e da sua qualidade. A conjugação de extratos de qualidade e pureza elevadas com a ampliação de regiões genómicas de pequeno tamanho parecem contribuir para uma melhor sensibilidade e especificidade dos referidos métodos. Além desses dois fatores, o tempo de armazenamento é outra questão de grande relevância na aplicação eficaz de qualquer uma das abordagens moleculares. Porque a maioria dos parâmetros analíticos são dependentes das variações ambientais, os métodos baseados na informação genética têm provado a sua utilidade para discriminar as diferentes cultivares da *Olea europaea*, bem como promover a identificação de outras espécies vegetais utilizadas como adulterantes. Até agora, vários marcadores de ADN foram utilizados com sucesso para a identificação de variedades de azeitona, com especial destaque para o SNP e SSR, que foram classificados como os marcadores mais eficientes. Apesar das vantagens atribuídas aos diferentes marcadores de ADN, muito trabalho é ainda necessário para se definirem métodos de referência/marcadores de ADN para a autenticação dos azeites.

## Referências

- [1] Petrakis, C. (2006). Olive Oil Extraction. In D. Boskou (ed), Olive Oil - Chemistry and Technology, pp. 191-225, AOCS Press, Champaign, Illinois.
- [2] Bulló, M., Lamuela-Raventós, R., & Salas-Salvadó, J. (2011). Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11: 1797-1810.
- [3] FAOSTAT, (2014). Disponível online: <http://faostat.fao.org/>. Data do último acesso: 25 de Maio, 2014.
- [4] Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science & Technology*, 26: 43-55.
- [5] Pafundo, S., Busconi, M., Agrimonti, C., Fogher, C., & Marmiroli, N. (2010). Storage-time effects on olive oil DNA assessed by amplified fragments length polymorphisms. *Food Chemistry*, 123: 787-793.
- [6] Aparicio, R., Morales, M. T., Aparicio-Ruiz, R., Tena, N., & García-González, D. L. (2013). Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Research International*, 54: 2025-2038.
- [7] Agrimonti, C., Vietina, M., Pafundo, S., & Marmiroli, N. (2011). The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 237-244.
- [8] Arlorio, M., Coisson, J. D., Bordiga, M., Travaglia, F., Garino, C., Zuidmeer, L., Van Ree, R., Giuffrida, M. G., Conti, A., & Martelli, A. (2010). Olive oil adulterated with hazelnut oils: simulation to identify possible risks to allergic consumers. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27: 11-18.
- [9] Vietina, M., Agrimonti, C., & Marmiroli, N. (2013). Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. *Food Chemistry*, 141: 3820-3826.

## Adulteração de Azeite

**Ivonne Delgadillo**

*Departamento de Químicas/Universidade de Aveiro*

Tal vez o azeite seja o alimento mais emblemático da Alimentação Mediterrânica, sendo hoje muito apreciado, não só na Europa, como também, cada vez mais, no resto do mundo, pelas suas propriedades nutritivas e organoléticas, assim como pela sua ação benéfica para a saúde. Desta forma, a olivicultura e a produção de azeite são atividades económicas de grande importância para as regiões produtoras. O alto preço no mercado do azeite virgem extra e o aumento da demanda têm provocado a sua falsificação por adição de óleos de custo mais baixo e mesmo azeites de menor qualidade.

O Conselho Oleícola Internacional (COI) define os azeites como aqueles extraídos do fruto da oliveira, por meios exclusivamente mecânicos ou outros meios físicos sob condições, particularmente condições térmicas, que não levem a alterações do produto, e que não tenham sido sujeitos a qualquer tratamento diferente da lavagem, decantação, centrifugação e filtração (COI). Nos azeites para consumo direto, inclui:

- **Azeite virgem extra:** azeite com acidez livre, expressa como ácido oleico, não superior a 0,8g por 100g e características que correspondam àquelas fixadas para esta categoria.

- **Azeite virgem:** azeite com acidez livre, expressa como ácido oleico, não superior a 2g por 100g e características que correspondam àquelas fixadas para esta categoria.

- **Azeite:** azeite com acidez livre, expressa como ácido oleico, não superior a 3,3g por 100g e características que correspondam àquelas fixadas para esta categoria. Esta categoria só pode ser comercializada em países que o permitam e deve obedecer à designação disposta legalmente no país de venda.

O **Azeite refinado** é produzido a partir de azeite virgem com características impróprias para consumo, o denominado azeite lampante (com acidez livre, expressa como ácido oleico, superior a 3,3g/100g).

No caso específico da União Europeia, as categorias do COI coincidem com a denominação das categorias de azeite que correspondem às características físico-químicas e organoléticas especificadas no anexo do Regulamento nº 136/66/CEE e no Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. As novas redações dadas pelos Regulamentos posteriores introduzem algumas diferenças em relação às categorias do azeite e parâmetros físico-químicos. O Regulamento (CE) nº 1019/2002 define que o “Azeite” contém azeite refinado e azeite virgem, desaparecendo a categoria “azeite virgem corrente” que corresponderia ao atual “Azeite” do COI. O Regulamento de execução (EU) nº 1348/2013 atualiza alguns métodos de análise e determinados valores-limite relativos às características dos azeites. Define valores de acidez livre para o “Azeite”, que não podem ultrapassar 1,0g por 100g, enquanto o azeite com acidez livre superior a 2,0g/100g já é considerado lampante. Igualmente a acidez do azeite refinado não pode ultrapassar os 0,3g/100g.

O COI e as Diretivas Europeias têm uma detalhada série de valores padrão e metodologias analíticas para os determinar com o fim de definir e auxiliar na classificação dos azeites e desta forma prevenir a adulteração ou processamentos diferentes da extração por meios mecânicos. Estes parâmetros incluem:

- Acidez livre (expressa como gramas de ácido oleico/100g),
- Índice de peróxidos < 20 mEq / kg,
- Composição em esteróis,
- Conteúdo de estigmastadieno,
- Conteúdo de ceras,
- Absorção no UV (232 e 270 nm)- dienos e trienos conjugados
- Número Equivalente de Carbono (ECN)- triglicéridos de número de carbono equivalente 42,

- Ácidos gordos *trans*,
- Composição dos triglicéridos.

Além das características químicas, o teste organolético também é um parâmetro importante na categorização do azeite como Azeite virgem extra. A análise organolética exige um painel treinado de 8 a 12 provadores. Para satisfazer as exigências de Azeite virgem extra, o painel deve determinar que o azeite não só não apresenta defeitos de sabor e cheiro, como também possui certos atributos organolépticos.

O Regulamento de execução (EU) nº 1348/2013 adapta os valores limite para os estigmastadienos, as ceras, o ácido mirístico e os ésteres alquílicos de ácidos gordos e apresenta esquemas de decisão para:

- verificação da conformidade de uma amostra de azeite com a categoria declarada com base em critérios de qualidade tais como a acidez, o índice de peróxidos, os valores da espectrofotometria no UV, a avaliação organolética e os ésteres etílicos. Os azeites que tenham sido classificados como conformes são sujeitos ao esquema de decisão seguinte:
- conformidade com os critérios de pureza com base no 3,5-estagmadienos, isómeros *trans* dos ácidos gordos, teor de ácidos gordos,  $\Delta$  NCE42, composição de esteróis e esteróis totais, eritrodiol + uvaol e ceras.

Igualmente introduz um esquema de decisão com parâmetros mais restritivos para o campesterol e o delta-7-estigmastenol.

Apesar da exaustiva lista de parâmetros utilizados para confirmar analiticamente a autenticidade de um azeite, a similaridade química entre os diferentes óleos vegetais dificulta uma verificação rápida de misturas em pequenas quantidades. Nos anos 90 foram desarticuladas em Itália e Espanha, redes de falsificação de azeite, com óleos de amêndoas e avelã provenientes da Turquia. Mais recentemente foram apreendidos em Itália 25.000 L de óleo de soja geneticamente modificada e de girassol, adicionados com beta-caroteno e clorofila, o qual estava engarrafado como sendo Azeite virgem extra.

As falsificações grosseiras são facilmente detetadas, seja pela aplicação das metodologias indicadas nas Diretivas Europeias e internacionais ou utilizando técnicas analíticas

sofisticadas. Frankel publicou, em 2010, um excelente artigo de revisão sobre a *Química do Azeite virgem extra, adulteração, estabilidade oxidativa e antioxidantes*, com múltiplas referências à utilização das mais variadas técnicas instrumentais. O problema, contudo, se coloca quando a adulteração é realizada com azeite refinado ou com azeites de menor qualidade, como é o caso dos azeites desodorizados por tratamento térmico suave.

Os ácidos gordos livres, os mono- di- e triglicéridos produzidos quando as azeitonas estão armazenadas antes da trituração são convertidos rapidamente em alquil ésteres por esterificação microbiana com etanol e metanol. A desodorização retira os cheiros desagradáveis e estes azeites desodorizados misturados com um azeite frutado poderiam, em teoria, passar a prova de um painel sensorial. Sendo azeites não refinados a maioria dos parâmetros físico-químicos deveriam estar dentro dos limites estabelecidos. Contudo, como a desodorização não retira os alquil ésteres, a sua presença pode ser considerada um bom marcador para azeite de baixa qualidade que foi submetido a uma desodorização suave (Pérez-Camino et al. 2008). Desde o 1 de Abril de 2014 o conteúdo em alquil ésteres foi introduzido no Regulamento 2568/91 (EEC) como novo parâmetro para avaliar a categoria dos azeites. Existe agora um limite de 75 mg/kg para o total de ésteres metílicos e etílicos de ácidos gordos (Regulamento de execução (EU) nº 1348/2013).

Em 2011 a Universidade da Califórnia Davis publicou um documento no qual reportava que 73% dos Azeites virgem extra, de marcas de topo, tinham defeitos e não foram aprovados em testes sensoriais por 2 painéis de provadores reconhecidos pelo COI, mesmo tendo sido aprovados na maioria dos parâmetros físico-químicos. O grupo de investigadores utilizou 2 parâmetros adicionais, os diglicéridos e as pirofotofitinas. Estes parâmetros, indicadores de degradação, foram os que mais correlacionaram com o parecer sensorial negativo dos provadores, assim como as medições no UV (Frankel et al, 2011).

A União Europeia reconhecendo que a adulteração do Azeite virgem extra, embora não represente um problema de índole sanitário, sim constitui uma fraude económica que

penaliza o consumidor, tem vindo desde os anos 90 a tentar definir e melhorar legislação e metodologias para a sua deteção. Em dezembro de 2013 a Comissão Europeia abriu uma chamada dedicada para projetos de investigação e inovação sobre Autenticação de Azeite (SFS-14a-2014). A chamada destina-se a desenvolver metodologias e/ou protocolos para detetar processamentos indesejáveis, incluindo a desodorização e adulteração e para verificar a qualidade do azeite, baseados em tecnologias avançadas. Espera-se encontrar metodologias que ajudem a aumentar a competitividade do Azeite.

## Referências

- COI - Conselho Oleícola Internacional. Consultado em maio de 2014: <http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-spanish/oliveWorld/aceite1.html>
- Frankel, E (2010) Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 5991–6006.
- Frankel, E., Mailer, RJ; Wang, SC; Schoemaker, CF; Guinard, JX; Flynn, JD; Sturzenberger, ND. (2011), Report on the Evaluation of Extra-Virgin Oil Sold in California. UC-Davis Olive Center. Consultado em maio de 2014: <http://olivecenter.ucdavis.edu/research/files/report041211finalreduced.pdf>
- Pérez-Camino, M. del C.; Cert, A.; Segura, A. R.; Cert-Trujillo, R.; Moreda, W. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6740–6744.
- Regulamento de execução (EU) nº 1348/2013 de 16 de dezembro de 2013. JO nº L338, de 17-12-2013. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1348&rid=1>
- Regulamento (CE) n.º 1019/2002 da Comissão, de 13 de junho de 2002, relativo às normas de comercialização do azeite (JO L 155 de 14.6.2002). [http://old.eu-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=302R1019&model=guichett](http://old.eu-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=302R1019&model=guichett)
- Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991R2568:20110401:PT:PDF>

## A análise de alimentos e a detecção da fraude

**Maria Jesus Tavares<sup>1</sup>, Graça Campos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Bebidas e Produtos Vitivinícolas/ASAE

<sup>2</sup> Laboratório de Físico Química/ASAE

Entende-se como fraude sobre mercadorias, segundo a definição legal do DL 28/84 a ação de quem, com intenção de enganar outrem nas relações negociais, fabricar, transformar, importar, exportar, tiver em depósito ou em exposição para venda, vender ou puser em circulação por qualquer outro modo mercadorias:

- a) Contrafeitas, falsificadas ou depreciadas, fazendo-as passar por autênticas, não alteradas ou intactas.
- b) De natureza diferente ou de qualidade e quantidade inferiores às que afirmar possuírem ou aparentarem

No setor alimentar este conceito materializa-se na alteração, ou falsificação do alimento ou na adição ou subtração de componentes dos alimentos que pode ter repercussões económicas e/ou de segurança do consumidor, conforme se trate de concorrência desleal ou atente contra a segurança alimentar.

A maior ou menor ocorrência de fraude está condicionada por fatores económicos e sociais. As crises económicas propiciam a fraude, bem como a livre circulação de bens e as crescentes facilidades de comunicação que potenciam o estabelecimento de redes a nível mundial.

Sempre existiu fraude e sempre existirá, no entanto a responsabilidade social das empresas tornou-se um assunto emergente, existindo já normas internacionais que a descrevem.

A crescente exigência na transparência da atuação dos operadores económicos é algo que acompanha a evolução das sociedades. Os consumidores estão cada vez mais atentos aos comportamentos das empresas e dos organismos controladores da sua atividade, podendo essa sensibilidade assumir forma institucional, através de organizações de consumidores que visam promover e garantir os seus direitos nos quais se incluiu a segurança dos alimentos que consomem. Também os operadores económicos, sobretudo em situações de crise económica, exigem de forma continuada dos organismos controladores a defesa dos seus direitos relativamente à garantia das condições de livre concorrência.

É pois neste contexto de crescente importância social e económica da fraude e de exigência na sua detecção que a análise físico-química e sensorial de alimentos, aplicada à detecção da fraude se integra.

A ASAE, através dos seus laboratórios, enquanto entidade que analisa e controla alimentos, conhece bem o facto das práticas fraudulentas estarem sempre em desenvolvimento e tenderem a evoluir de acordo com as potencialidades analíticas dos organismos controladores.

Este facto obriga a que as potencialidades analíticas disponíveis nos seus laboratórios sejam utilizadas de forma integrada e os resultados apreciados em conjunto. Deste modo, as análises físico-químicas e sensoriais dos alimentos têm de ser entendidas como complementares e indispensáveis à caracterização de qualquer tipo de alimento.

Um exemplo clássico de fraude económica é a adição de água ao leite ou ao vinho para aumentar o seu volume, permitindo assim a obtenção de lucro indevido. Este tipo de fraude é economicamente relevante.

Também a mistura de leite de vaca em queijos declarados como sendo de ovelha ou cabra ou mistura Ovelha/Cabra ilustra o caso de fraude económica sem que seja diretamente posta em causa a segurança alimentar. O valor comercial da matéria-prima incorporada no fabrico do queijo é determinante para o lucro obtido. De valor comercial mais reduzido, o leite de vaca, se adicionado ao leite de cabra e/ou ovelha é uma fraude que lesa o consumidor na expectativa da genuinidade do produto que adquire e garante maior lucro ao seu produtor. A legislação estabelece como fraude a detecção de mais de 1% de leite de vaca em mistura com o leite das espécies declaradas.

Exemplo de outro tipo de fraude é a adição de um conservante proibido ou em teor superior ao limite legal permitido (sulfitos em carne ou ácido sórbico em sumos) de modo a prolongar indevidamente a sua vida útil. Este tipo de fraude tem relevância económica e também tem relevância em termos de segurança do consumidor que potencialmente corre risco ao consumir estes alimentos.



A detecção da fraude é geralmente uma tarefa complexa e que obriga a uma interpretação conjunta de dados que vai muito para além do cumprimento dos limites legais, passando pelo conhecimento das tecnologias de fabrico e dos valores tecnicamente admissíveis e caracterizadores de cada tipo de alimento.

Exemplo : Fraude em Azeites

O azeite é um produto de excelência muito utilizado na dieta mediterrânea tendo um efeito benéfico para a saúde devido às suas propriedades antioxidantes, por ser rico em ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados, polifenóis e Vitaminas. Por este facto e por poder ser comercializado em várias categorias é com frequência sujeito a fraude, tanto na sua classificação como na sua genuinidade (adulteração)

Para que o azeite seja comercializado é necessário que se apresente de acordo com as especificações legisladas, com base em análises físico-químicas e sensoriais (Regulamento 2568/91 e suas alterações).

As análises físico químicas efetuadas nos azeites permitem identificar duas situações:

**Verificação da categoria declarada - Critérios de qualidade** que dependem do processo de fabrico, qualidade das azeitonas, e alterações com o tempo e condições de armazenagem, por exemplo temperatura e reações com a luz e/ou oxigénio o que conduz a um aumento da acidez, dos peróxidos presentes e a alteração das absortividades características.

**Verificação da identidade - Critérios de pureza** - em que se verifica se o azeite não está adulterado: misturado com óleo de bagaço de azeitona, ou outro tipo de óleos refinados, óleos de sementes oleoginosas ou outras gorduras. Os parâmetros mais relevantes para os critérios de pureza são o perfil de ácidos gordos, os estigmastadienos (adição de refinados), Esteróis e ECN 42 (mistura com gordura de outras origens); Ceras e eritrodiol/uvaol (adição de óleo de bagaço de azeitona).

A análise sensorial efetuada nas amostras de azeite destina-se a determinar os valores da mediana do frutado e da mediana dos defeitos.

Estão estipulados valores máximos para estes 2 parâmetros tendo em conta a categoria declarada. A título exemplificativo, indicam-se os valores previstos para os azeites virgem extra, que não podem apresentar qualquer defeito e a mediana do frutado tem de ser superior a zero.

No caso dos azeites virgens e azeites virgem extra há que complementar os resultados dos vários parâmetros obtidos da análise físico-química com os resultados da análise sensorial uma vez que ambas são requeridas para garantir a qualidade específica da categoria declarada para o produto.

## Diversidade biológica da oliveira e autenticidade de azeites

**Miguel A. Faria\*, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira**

REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto  
Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

\*autor correspondente: [mfaria@ff.up.pt](mailto:mfaria@ff.up.pt)

### Resumo

A oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) está entre as culturas mais antigas sendo atualmente das espécies mais cultivadas na região Mediterrânica. Estão descritas cerca de 1200 cultivares, oriundas de 54 países, as quais conferem a tipicidade aos azeites, juntamente com as características edafoclimáticas das regiões de produção. Esta tipicidade, cada vez mais valorizada a nível internacional, tem sido incorporada na actual produção de azeites de alta qualidade elaborados para apresentar características específicas. Características estas intimamente relacionada com determinada composição varietal (i.e. mistura de um grupo definido de cultivares ou mesmo azeites produzidos com uma cultivar única, os monovarietais). Obtêm-se assim produtos de maior valor económico, geralmente protegidos em termos legais. Por conseguinte, o conhecimento da diversidade genética das diversas variedades a nível molecular é essencial para o desenvolvimento de marcadores genéticos capazes da discriminação das mesmas, posteriormente aplicados na avaliação da autenticidade de azeites extra virgens de alto valor acrescentado como os DOP ou IGP. O presente trabalho pretende abordar a diversidade biológica da oliveira a nível mundial e a forma como esta está a ser explorada no desenvolvimento de metodologias baseadas na análise de ADN para autenticação de azeites DOP, contribuindo assim para a valorização económica destes e a sua afirmação como um produto protegido, sujeito a mecanismos de controlo, de alto valor acrescentado e com benefícios para a saúde humana.

### As Cultivares de Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie emblemática da família das *Oleaceae* que inclui também o género *Fraxinus* (e.g. freixo), *Ligustrum* (e.g. alfeneiro), *Jasminum* (e.g. jasmim) e *Syringa* (e.g. lilás). Segundo Green (Green, 2002) a espécie compreende um complexo botânico no qual podem ser identificadas seis sub-espécies: *cuspidata*, *laperrinei*,

*maroccana*, *cerasiformis*, *guanchica* e *europaea*. Esta última, *Olea europaea* subsp. *europaea*, inclui uma forma silvestre denominada *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Zambuieiro) e uma forma cultivada, *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*, única produtora de frutos edíveis e com interesse agrícola (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). Esta última será, então, a forma correta de designação da oliveira cultivada.

Apesar dos origens desta cultura se terem perdido no tempo existem alguns indícios que terá sido iniciada há cerca de 6 milénios, no Médio Oriente. A oliveira terá então sido primordialmente cultivada por povos Hamitas e Semitas, habitantes da região a Sul do Cáucaso e Oeste do planalto Iraniano. Há algumas indicações linguísticas que suportam esta hipótese, como por exemplo: o termo “zait” é derivado da língua Semita e seria usado em referência às oliveiras e seus produtos. Na língua Árabe a oliveira designa-se ainda hoje por “zeitun” sendo também evidente a sua relação com as palavras Portuguesas azeite e azeitona. Após a domesticação e subsequente implementação da cultura nessa região, as migrações populacionais e o comércio marítimo dos séculos seguintes tornaram possível a disseminação da oliveira por toda a bacia do Mediterrâneo, implantando-se em países onde assume hoje uma importância crucial como na Grécia, Itália, França, Espanha e Portugal. Na época da expansão marítima iniciou-se o cultivo da oliveira no novo mundo, pela mão de colonizadores Espanhóis (Bartolini & Petrucci, 2002) e Portugueses. A bacia do Mediterrâneo, sendo a área tradicional do cultivo da oliveira, engloba 95% dos olivais do mundo. Todavia, a cultura continua a expandir-se para áreas como a Austrália, Argentina, Chile, EUA, África do Sul e mesmo locais mais exóticos como o Havaí (Chiappetta & Muzzalupo, 2012), devido essencialmente ao reconhecimento das excepcionais características nutricionais do azeite (fonte de ácidos gordos benéficos, compostos fenólicos, vitamina E, carotenos, etc.).

Ao longo dos séculos foram surgindo inúmeras variedades por força da multiplicação espontânea via reprodução sexuada (i.e. através da germinação de sementes). A oliveira é uma espécie alogâmica pelo que os descendentes são sempre originados pelo cruzamento entre plantas diferentes o que lhes permite expressar características híbridas, refletindo a variabilidade genética dos dois progenitores (Peixe et al., 2013). O pólen originado por uma árvore pode percorrer grandes distâncias até fecundar outra planta. Este facto favorece a variabilidade genética e o aparecimento de um grande número de cultivares. As árvores mais adaptadas às condições edafoclimáticas de cada região - as mais produtivas, mais resistentes a doenças e que produzem frutos com características mais apreciadas - foram sendo empiricamente selecionadas pelos agricultores e multiplicadas por via assexuada ou vegetativa (Khadari & Bervillé, 2000). A multiplicação das plantas mais interessantes por estacaria permite a obtenção de clones (plantas genotípica e fenotipicamente idênticas à planta mãe) utilizados na plantação de olivais.

Das complexas relações genéticas entre as inúmeras cultivares ancestrais emergiu uma considerável diversidade perpetuada até aos nossos dias (Trujillo et al., 2013). Esta diversidade configura atualmente uma herança cultural e biológica que deve ser preservada e estudada pois constitui uma potencial fonte de soluções para os problemas que irão surgir na área da olivicultura, devido às previsíveis alterações edafoclimáticas e, mesmo, potencial fonte de substâncias bioativas.

De acordo com a base de dados de referência na compilação de germoplasma de oliveira a nível internacional (<http://www.oleadb.it/>) estão identificadas cerca de 1200 cultivares de oliveira, oriundas de 54 países. Nesta base de dados, criada por Giorgio Bartolini do Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Itália, podem ser obtidas informações sobre a cultivares como o nome comum, as sinónimas, áreas de cultivo e descritores (as características morfológicas usadas para a sua discriminação visual). Nos últimos 20 anos, todavia, o desenvolvimento tecnológico agrícola e os consequentes melhoramentos da olivicultura, focando principalmente a produtividade das plantas, aumentaram o risco de erosão genética da oliveira devido à substituição das culturas tradicionais por um número reduzido de cultivares (e.g. Arbequina) com características mais adaptadas à colheita mecanizada. Desta forma, a identificação e

preservação das cultivares tradicionais torna-se um imperativo de modo a assegurar a possibilidade de aproveitamento do potencial dessas árvores no futuro (Rallo et al., 2013). Esta preservação só pode ser feita com recurso à criação de bancos de germoplasma onde, no caso das culturas propagadas vegetativamente, são plantadas, mantidas e estudadas coleções vivas *ex-sito*. Este trabalho tem vindo a ser executado quer nos países Mediterrânicos quer nas novas regiões produtoras como os EUA, Chile, África do Sul, Austrália e China. Existem assim cerca de uma centena de coleções de recursos genéticos de oliveira espalhadas pelo mundo (<http://www.oleadb.it/collections>). Em Portugal encontram-se alguns bancos de germoplasma dedicados à recolha e manutenção das variedades regionais, por técnicos qualificados, em vários locais do país. Existe ainda uma considerável coleção de variedades na Estação Agronómica Nacional, em Oeiras e encontra-se em fase de implementação a Coleção Nacional de Referência de Cultivares de Oliveira, no Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INRB, em Elvas, que tem como principal objetivo a preservação e valorização da diversidade varietal autóctone de oliveira das regiões olivícolas portuguesas.

A nível internacional, um dos maiores e mais importantes locais de conservação de oliveira é o Banco Mundial de Germoplasma de Oliveira, em Córdoba, Espanha (Caballero & Río, 2008). Neste campo, estão plantadas 499 plantas oriundas de 21 países, representativas da diversidade genética mundial. A plantação, num mesmo local, de tão grande diversidade permite o desenvolvimento dos mais diversos ensaios comparativos entre cultivares, sem interferência das variações edafoclimáticas. Também os casos de sinonímia (nomes diferentes atribuídos à mesma cultivar), homonímia (o mesmo nome usado em diferentes cultivares) e identificação incorrecta, muito frequentes principalmente entre diferentes países produtores, podem mais facilmente ser resolvidos nestas condições. No ano de 2003, uma réplica do banco mundial de Córdoba foi estabelecida Tessaout, Marrocos (Haouane et al., 2011).

Na tabela 1 são apresentadas, a título de exemplo, as cultivares de 24 países de acordo com a seleção das mais representativas, apresentada no Catálogo Mundial de Cultivares de Oliveira (FAO). No caso de Portugal indicam-se as cultivares portuguesas com maior interesse agronómico segundo a “Descrição das 22 variedades de Oliveira cultivadas em Portugal” (Leitão et al., 1986).

Tabela 1. Cultivares de O. europaea representativas de 24 países, Mediterrânicos e produtores mais recentes.

PAÍS	CULTIVAR	PAÍS	CULTIVAR
<b>Albania</b>	Kalinjot	<b>Itália</b>	Ascolana Tenera
<b>Algéria</b>	Azeradj		Biancoliila
	Blanquette de Guelma		Carolea
	Chemlal de Kabylie		Coratina
	Limli		Dritta
	Sigoise		Frantoio
<b>Argentina</b>	Arauco		Giarraffa
<b>Chile</b>	Azapa		Itrana
<b>Chipre</b>	Ladoelia		Leccino
<b>Croácia</b>	Lastovka		Moraiole
	Levantinka		Nocellara del Belice
	Oblica		Ottobratica
<b>Egipto</b>	Aggezi Shami		Pendolino
	Hamed		Rosciola
	Toffahi		Taggiasca
<b>Eslovénia</b>	Bianchera	<b>Jordânia</b>	Rasi'i
<b>Espanha</b>	Arbequina	<b>Jugoslávia</b>	Zutica
	Bical	<b>Líbano</b>	Soury
	Blanqueta	<b>Marrocos</b>	Haouzia
	Carrasqueño de la Sierra		Menara
	Castellana		Meslala
	Changlot Real		Picholine marocaine
	Cornicabra	<b>Palestina</b>	Nabali Baladi
	Farga	<b>Portugal</b>	Carrasquenha
	Gordal de Granada		Cobrançosa
	Gordal Sevillana		Cordovil de Castelo Branco
	Hojiblanca		Cordovil de Serpa
	Lucio		Galega Vulgar
	Manzanilla Cacereña		Maçanilha Algarvia
	Morisca		Redondal
	Morrut		Azeiteira
	Picual		Conserva de Elvas
	Royal de Cazorla		Negrinha
	Sevillanca		Madural
	Verdial de Badajoz		Verdeal Transmontana
	Villalonga		Redondil
<b>EUA</b>	Mission		Galega Grada de Serpa
<b>França</b>	Aglandau		Cordovil de Serpa
	Bouteillan		Verdeal Alentejana
	Grossane		Bical de Castelo Branco
	Lucques		Maçanilha Carrasquenha
	Picholine Languedoc	<b>Síria</b>	Abou-Satl
	Salonenque		Doebli
	Tanche		Kaissy
<b>Grécia</b>	Adramitini		Sorani
	Amigdalolia		Zaity
	Chalkidiki	<b>Tunísia</b>	Chemlali de Sfax
	Kalamon		Chétoui
	Konservolia		Gerboui
	Koroneiki		Meski
	Mastoidis		Oueslati
	Megaritiki	<b>Turquia</b>	Ayvalik
	Valanolia		Çekiste
<b>Irão</b>	Fishomi		Domat
	Rowghani		Erkence
	Mari		Gemlik
<b>Israel</b>	Barnea		Izmir Sofralik
	Kadesh		Memecik
	Merhavia		Uslu

### **Diversidade de azeites e avaliação da sua autenticidade varietal**

O azeite é atualmente percebido pelos consumidores como um produto alimentar de alta qualidade. O seu valor económico está dependente, em primeiro lugar, da categoria com que foi classificado (virgem extra, virgem, lampante). No entanto, dentro da superior categoria dos azeites virgens extra existe uma grande variação no seu valor de mercado devido a características como a tipicidade organoléptica ou a área de origem da produção, cuja designação e rotulagem são legalmente protegidas em sistemas como DOP e IGP (Regulamento CE 2082/92). Estes produtos são usualmente obtidos a partir de determinadas variedades, em percentagens definidas nos cadernos de especificações. Para além do referido, o aparecimento no mercado de azeites monovariais (produzidos com recurso a uma só cultivar) tem vindo a intensificar-se, à semelhança do sucedido no mercado vitivinícola nos últimos anos. A cultura da diversidade de variedades na produção tem sido promovida em alguns países, como a Itália, resultando numa maior diversificação do azeite virgem extra o que configura uma base de atracção dos consumidores exigentes (Rotondi, Magli, Morone, Alfei, & Pannelli, 2013). Estes, mais atentos às características do produto, à sua diversidade e benefícios para a saúde, o que em muito contribui para um maior valor comercial do azeite, tornando-o um alvo apetecível para práticas de adulteração.

A tipicidade organoléptica de um azeite extra-virgem é determinada por fatores genéticos (cultivares), agronómicos, ambientais e pelos processos tecnológicos de extração. No entanto, a matriz genética, definida pelas cultivares, assume um papel relevante na tipicidade sensorial (Rotondi, Alfei, Magli, & Pannelli, 2010). Atualmente os azeites são avaliados em termos organolépticos com recurso a 13 atributos: 9 olfativos (frutado, folha verde, erva, amêndoa, tomate, maçã, alcachofra, bagas e ervas aromáticas) e 4 gustativos (frutado, amargo, picante e a fluidez). Estes atributos são quantitativamente avaliados obtendo-se assim um registo do perfil organoléptico de cada azeite (Rotondi et al., 2013). Todavia, tendo em conta a variabilidade biológica intrínseca à planta e a provocada pelas diferentes condições edafoclimáticas, a avaliação dos atributos organolépticos nem sempre é suficientemente objetiva para assegurar a autenticidade do azeite. É assim necessário o desenvolvimento de ferramentas laboratoriais capazes de identificar as

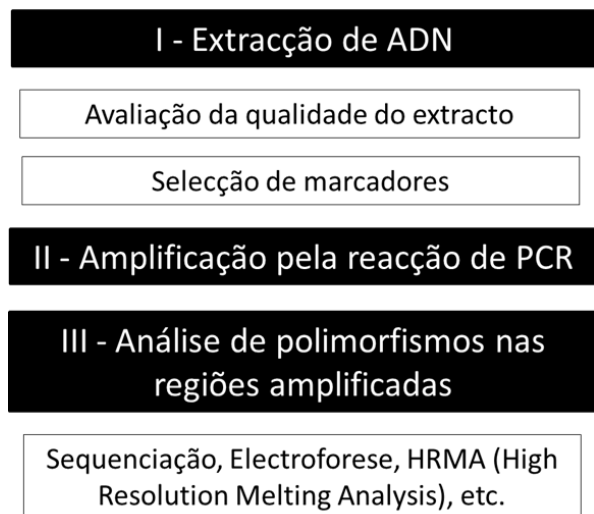
cultivares constituintes no produto final azeite. Este tipo de controlo requer, portanto, metodologias com um poder de discriminação a um nível inferior ao da sub-espécie, só possível através da análise de ADN, nomeadamente de regiões genéticas variáveis entre cultivares.

### **Métodos moleculares para avaliação da autenticidade**

A autenticidade de um azeite, particularmente de um azeite virgem extra, é tradicionalmente avaliada a nível laboratorial com recurso a marcadores químicos como os esteróis, compostos fenólicos, ácidos gordos, triacilgliceróis, compostos voláteis, tocoferóis, etc. No entanto, a composição química do azeite é altamente influenciada por fatores ambientais e agronómicos pelo que apenas a utilização de marcadores unicamente dependentes das cultivares constituintes poderá ser adequada à autenticação botânica (cultivares) e geográfica. Este facto levou ao desenvolvimento de marcadores baseados no ADN uma vez que estes são independentes das condições ambientais e tecnológicas (Enferadi & Rabiei, 2013).

O principal obstáculo à utilização de marcadores moleculares na autenticidade do azeite é a extração de ADN. Quantidades significativas desta molécula podem ser encontradas no azeite obtido por extração a frio, todavia, subsequentes processamentos tecnológicos como a filtração e a natural atividade de nucleases que degradam o ADN durante o armazenamento têm como consequência a diminuição da quantidade de ácidos nucleicos no azeite (Consolandi et al., 2008). Obtêm-se assim, da azeites embalados, extratos com baixa concentração, ADN muito degradado e, adicionalmente, contendo substâncias inibidoras das reações necessárias para a análise subsequente, como os compostos fenólicos inibidores da polimerase do ADN, essencial na amplificação dos marcadores alvo pela reação de PCR (reação em cadeia da polimerase do ADN). A diminuta quantidade de ADN obtida do azeite não é, contudo, o maior problema da aplicação das técnicas moleculares. O principal obstáculo reside na elevada degradação apresentada pela molécula o que diminui drasticamente a informação nesta contida (Enferadi & Rabiei, 2013). Várias técnicas têm sido propostas para superar as dificuldades da extração de ADN com resultados satisfatórios e bons trabalhos de revisão sobre o assunto têm sido publicados (Breton, Claux, Metton, Skorski, & Bervillé, 2004).

Ultrapassado o primeiro obstáculo, a obtenção de um extrato de ADN suficientemente puro, surge a necessidade da seleção dos marcadores apropriados. Marcadores de ADN são, em suma, regiões da molécula de tamanho relativamente pequeno contendo variações na sua sequência que permitem discriminar as cultivares. A maioria destes marcadores são previamente amplificados pela reação de PCR e posteriormente analisados recorrendo a diversas técnicas laboratoriais. Muitos marcadores foram já utilizados para a discriminação de cultivares em azeite como por exemplo: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*), SSR (*Single Sequence Repeats* ou *microsatélites*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Vários trabalhos de revisão sobre o tipo de marcadores moleculares usados na autenticidade de azeite têm sido publicados dos quais saliento dois (Ben-Ayed, Kamoun-Grati, & Rebai, 2013; Bracci, Busconi, Fogher, & Sebastiani, 2011). A figura 1 resume a sequência analítica a que um azeite é sujeito para a avaliação da sua autenticidade por métodos moleculares.



**Figura 1.** Sequência laboratorial das técnicas analíticas para avaliação da autenticidade varietal de um azeite

Apesar do grande número de marcadores que têm sido utilizados os mais recentes trabalhos de investigação focam a aplicação dos marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). SNPs são variações da sequência em regiões determinadas do genoma, em apenas um nucleótido, o que permite a existência de diferentes alelos nos indivíduos de uma população normal. São a forma mais abundante de

variação nos genomas o que os torna um alvo preferencial quando é necessário realizar a discriminação de indivíduos muito semelhantes (Brookes, 1999). A identificação de SNPs altamente polimórficos tem sido o principal objetivo de estudos muito recentes possibilitados pelas mais modernas técnicas de sequenciação de ADN como a sequenciação paralela ou NGS (*Next Generations Sequencing*) aplicadas à sequenciação massiva do genoma das variedades mais importantes a nível mundial (Kaya et al., 2013; Pérez-Jiménez, Besnard, Dorado, & Hernandez, 2013). Estes marcadores podem ser analisados recorrendo a diversas técnicas incluindo a amplificação da região do SNP pela reação de PCR e subsequente análise pela recente técnica de HRMA (*High Resolution Melting Analysis*) (Faria, Magalhães, Nunes, & Oliveira, 2013).

A sequenciação completa do genoma da oliveira, principal objetivo do Consórcio Internacional do Genoma da Oliveira (<http://olivegenome.karatekin.edu.tr/>) está em curso, assim como a resequenciação de regiões variáveis em frações consideráveis do genoma das cultivares mais importantes, o que permitirá o desenvolvimento de novos e mais efetivos marcadores para discriminação a nível inter-varietal.

O aparecimento de azeites com características distintas, com base mono-varietal ou produzidos a partir de um pequeno número de cultivares, aumenta o interesse dos consumidores no azeite de alta qualidade e, consequentemente, o seu valor económico. Este facto é motivador do interesse dos grupos de investigação internacionais que têm demonstrado uma grande atividade no desenvolvimento de soluções, baseadas na mais recente tecnologia analítica, para garantir a autenticidade do azeite. O desenvolvimento de um produto *sui generis*, autêntico e saudável, assegurado pela atuação sinérgica de produtores, entidades reguladoras e investigação, garantirá, certamente, um futuro promissor ao produto de maior importância da cultura Mediterrânica, o azeite.

#### Agradecimentos

Miguel A. Faria agradece ao projeto “NORTE- 07-0124-FEDER-000069 - Ciência do Alimento”, co-financiado pelo “Programa Operacional Regional do Norte” (ON.2 – O Novo Norte), do “Quadro de Referência Estratégico Nacional” (QREN), através “Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional” (FEDER).



## Bibliografia

- Bartolini, G; Petruccelli, R. (2002). Classification, origin, diffusion and history of the olive. (U. G. Tindal, H. D.; Menini, Ed.) *Classification, origin, diffusion and history of the olive* (p. 74). Roma: FAO.
- Ben-Ayed, R., Kamoun-Grati, N., & Rebai, A. (2013). An Overview of the Authentication of Olive Tree and Oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 218–227.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30(4), 449–62.
- Breton, C., Claux, D., Metton, I., Skorski, G., & Bervillé, A. (2004). Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 531–7.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177–86.
- Caballero, J. M., & Río, C. Del. (2008). The Olive World Germplasm Bank of Spain. In *Acta Horticulturae* (Vol. 791 PART 1, pp. 31–38).
- Chiappetta, A., & Muzzalupo, I. (2012). Botanical Description. In I. Muzzalupo (Ed.), *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy* (pp. 23–28). InTech.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Severgnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., Castiglioni, B. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR–universal array analysis. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1429–1438.
- Enferadi, S., & Rabiei, Z. (2013). Challenges for Genetic Identification of Olive Oil. In *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*.
- FAO. (n.d.). *World Catalogue of Olive Varieties* (p. 320). Rome: International Olive Council (IOC).
- Faria, M. A., Magalhães, A., Nunes, M. E., & Oliveira, M. B. P. P. (2013). High resolution melting of trnL amplicons in fruit juices authentication. *Food Control*, 33(1), 136–141.
- Green, P. S. (2002). A Revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57(1), 91–140.
- Haouane, H., El Bakkali, A., Moukhli, A., Tollon, C., Santoni, S., Oukabli, A., Khadari, B. (2011). Genetic structure and core collection of the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: towards the optimised management and use of Mediterranean olive genetic resources. *Genetica*, 139(9), 1083–94.
- Kaya, H. B., Cetin, O., Kaya, H., Sahin, M., Sefer, F., Kahraman, A., & Tanyolac, B. (2013). SNP discovery by illumina-based transcriptome sequencing of the olive and the genetic characterization of Turkish olive genotypes revealed by AFLP, SSR and SNP markers. *PLoS One*, 8(9), e73674.
- Khadari, G. B. B., & Bervillé, P. V. A. (2000). Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.), 1018–1024.
- Leitão, F.; Potes, L. F.; Calado, M. L.; Almeida, F. J. (1986). Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Lisboa: Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.
- Peixe, A.; Calado, M. L.; Porfírio, S. (2013). Propagação da oliveira – metodologias e sua evolução. In J. Bohm (Ed.), *O grande livro da oliveira e do azeite* (pp. 101–119). Lisbon: Dinalivro Editora.
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G., & Hernandez, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS One*, 8(8), e70507.
- Rallo, L., Barranco, D., Castro-García, S., Connor, D. J., Gómez del Campo, M., & Rallo, P. (2013). High-Density Olive Plantations. In *Horticultural Reviews Volume 41* (pp. 303–384). John Wiley & Sons, Inc.
- Rotondi, A., Alfei, B., Magli, M., & Pannelli, G. (2010). Influence of genetic matrix and crop year on chemical and sensory profiles of Italian monovarietal extra-virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15).
- Rotondi, A., Magli, M., Morrone, L., Alfei, B., & Pannelli, G. (2013). Italian National Database of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. In *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*.
- Trujillo, I., Ojeda, M. a., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., & Díez, C. M. (2013). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10(1), 141–155.

## Efeito do armazenamento e do processamento térmico na qualidade do azeite

**Susana Casal\*, Carla Santos, Sara Cunha, José Alberto Pereira**

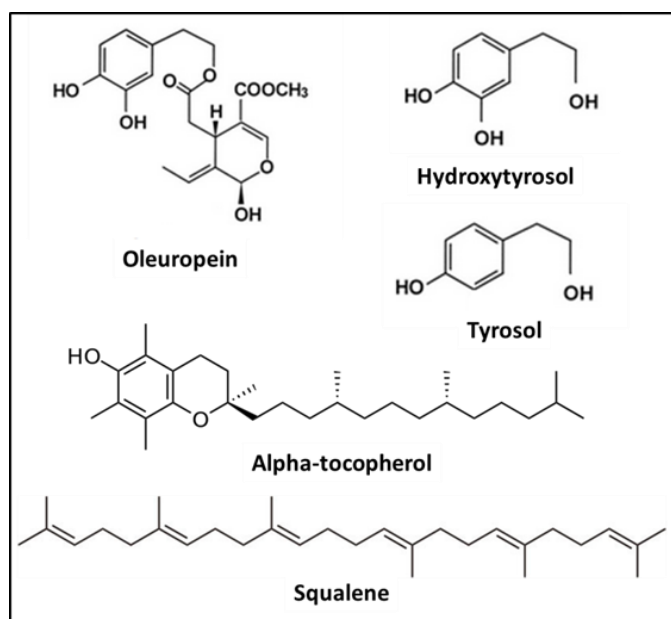
REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia, Departamento de Química e Hidrologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto  
 Autor correspondente: [sucasal@ff.up.pt](mailto:sucasal@ff.up.pt)

O azeite virgem extra é único entre os óleos vegetais comerciais. A sua composição equilibrada determina uma estabilidade oxidativa elevada, simultaneamente com características sensoriais de excelência e efeitos positivos para a saúde. Inicialmente estes efeitos eram suportados maioritariamente pela riqueza em ácidos gordos monoinsaturados mas ao longo dos anos tem vindo a ser provado cientificamente que os seus constituintes minoritário desempenham um papel tão, ou mais importante. Hoje sabemos claramente que esses compostos extraídos do fruto da oliveira juntamente com os triglicerídeos são responsáveis por muitas das propriedades tecnológicas e efeitos na saúde do azeite virgem (Pérez-Jiménez et al, 2007).

O azeite virgem extra é classificado de acordo com o seu método de extração, puramente físico e processado a baixas temperaturas, e pelas características organoléticas e químicas do produto final (Regulamento (UE) n.º299/2013). Na verdade, o azeite virgem é dos poucos óleos vegetais que pode ser consumido no seu estado cru, tal como extraído, retendo por isso a maior parte dos compostos extraídos do fruto enquanto os óleos vegetais comerciais são obrigatoriamente refinados. Apesar da refinação promover a remoção de defeitos químicos e sensoriais, retira também a “frescura” e a identidade sensorial. Isto faz com que o azeite seja um produto delicado e ao mesmo tempo único, uma vez que reflete diretamente a qualidade e defeitos das matérias-primas que o originaram e do processamento aplicado.

De entre os compostos minoritários que tornam o azeite uma gordura tão particular na dieta humana, os compostos fenólicos têm um papel predominante. Estes compostos apresentam propriedades antioxidantes e contribuem simultaneamente para o flavour e sabor característico dos mesmos. A presença de alfa-tocoferol (vitamina E), carotenoides, esqualeno, e esteróis, entre outros (Figura 1), origina uma eficiente rede que reduz a degradação oxidativa do azeite, ao mesmo tempo que fornece aos consumidores um conjunto de compostos bioativos com elevado potencial

para a saúde (Rastrelli et al, 2002). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos, em particular da oleuropeína e do hidroxitirosol (Figura 1) têm sido as mais estudadas. Os compostos fenólicos do azeite tem demonstrado em estudos experimentais serem eficientes na proteção contra a oxidação dos lípidos, DNA e colesterol-LDL (Covas, 2006), retardando a progressão da aterosclerose em modelos animais. Para além disso, existem igualmente evidências que o beta-sitosterol e o polifenóis do azeite inibem a formação de espécies reativas de oxigénio, reduzindo a suscetibilidade à oxidação das partículas LDL e a peroxidação das membranas dos eritrócitos (Pérez-Jiménez et al, 2007).



**Figura 1:** Compostos minoritários com elevada relevância no azeite virgem

Infelizmente, e por oposição a um bom vinho, a qualidade do azeite não aumenta com o tempo. A partir do momento em que os lípidos são removidos do fruto inicia-se um processo de degradação em retorno e a sua qualidade começa a diminuir em consequência de reações de oxidação e, em menor extensão, hidrólise. Assim, para assegurar os

interesses do consumidor, o propósito último da cadeia de produção do azeite, deve ser dada atenção a quatro pontos principais: a qualidade das azeitonas, o processo de extração do azeite, as condições de armazenamento e o seu uso adequado. Os dois primeiros pontos são determinados pelos produtores e extratores de azeite, que garantem que a informação rotulada no momento do envasamento. A partir daí, as garrafas de azeite passarão por vendedores e compradores, sendo frequentemente expostas a condições ambientais pouco adequadas à sua preservação. Isto decorre maioritariamente da falta de informação, sendo comum pensar-se que, independentemente das condições de armazenamento, o produto dentro da garrafa mantém as suas características desde que foi embalado até ao seu prazo de validade rotulado. Completamente errado. Esta pequena revisão pretende chamar a atenção principalmente para o correto armazenamento do azeite e uso doméstico, salientando as principais alterações que são inevitavelmente decorrem com o envelhecimento do azeite e medidas adequadas para as reduzir.

**Processamento do azeite:** apesar de não estar nas “mãos do consumir, é importante entender que mesmo com os melhores processos e equipamentos de extração não é possível produzir um azeite de qualidade a partir de azeitonas com defeito. Mesmo a presença de uma pequena quantidade de azeitonas danificadas pode originar defeitos num lote inteiro de azeite, impedindo imediatamente a sua classificação comercial com virgem extra. Na verdade, um azeite mais antigo pode até ser de melhor qualidade do que um azeite novo processado com azeitonas com defeito (Aparicio-Ruiz et al, 2014). Por outro lado, se o processo de extração não for feito adequadamente, azeitonas de elevada qualidade podem originar azeites de baixa qualidade. A extração deve ocorrer logo após a apanha e deve ser rápida, sem recurso a aquecimento, para reduzir a hidrólise e oxidação, e consequentemente a perda dos compostos antioxidantes naturalmente presentes. Após extração o azeite está no seu culminar de frescura e favor ideal. A partir daí o azeite perderá gradualmente a sua cor característica e intensidade organoléptica. O tipo de azeitonas utilizado e o seu estado de maturação condicionam também a composição do azeite obtido, em particular pela presença dos compostos fenólicos, que decrescem com a maturação, e alteração das propriedades sensoriais, com uma redução dos atributos frutados e

aumentos dos doces.

#### **Armazenamento do azeite:**

Tal como muitos outros produtos sazonais que são consumidos ao longo do ano, o azeite tem que ser armazenado. Por isso, após extração, o óleo é reservado em lotes, sendo usualmente engarrafado apenas quando é formalizada a sua venda. Sem nenhuma restrição legal que restrinja o seu prazo de validade e sabendo que este dependerá principalmente da composição do azeite e das condições de armazenamento, os promotores definem usualmente a data de validade com base na data de extração, ajustando-a às características analíticas que o produto apresenta no embalamento, sendo usual entre 9 até 24 meses.

Contudo, mesmo em condições adequadas de armazenamento o azeite oxide-se lentamente, sendo esta a sua principal causa de deterioração. Tal como mencionado, o tempo de vida do azeite é muito variável, dependendo da variedade da azeitona, do seu estado de maturação, do cuidado

aplicado durante a extração e do armazenamento, sendo difícil definir um tempo de vida real. Para além disso, mesmo o melhor azeite virgem-extra perdera as suas propriedades e classificação se inadequadamente armazenado. Infelizmente é frequente ver as garrafas de azeite diretamente expostas à luz branca em diversas superfícies comerciais e mesmo na casa dos consumidores algumas garrafas de azeite são mantidas à luz, como se de objetos de decoração se tratassem. O consumidor poderá, no primeiro caso, não estar a adquirir o produto com as características rotuladas ou estraga-lo antes de o consumir.

Os ácidos gordos polinsaturados são o principal foco da oxidação. Para os proteger do dano oxidativo, os antioxidantes naturais do azeite virgem cooperam eficientemente. A vitamina E, o antioxidante mais importante no azeite, é o primeiro antioxidante a ser consumido. Quando este desaparecer, os seus produtos de oxidação tornam-se parcialmente pró oxidantes, e assim capazes de oxidar outras moléculas, como o squaleno, gerando-se uma reação em cadeia que, no seu final, não será mais capaz de prevenir a oxidação dos ácidos gordos insaturados. A perda de compostos antioxidantes neste processo reduz os efeitos potenciais para a saúde do consumidor, e os compostos que são formados

nestas complexas reações podem dar cheiro e sabor desagradável ao azeite, para além de poderem também apresentar alguma toxicidade (Rastrelli et al, 2002).

São três os principais fatores reesponsáveis pela degradação do azeite engarrafado: oxigénio, luz e temperatura. Para o preservar, o azeite deve ser guardado no escuro, na ausência de oxigénio e sob baixas temperaturas. O oxigénio induz a peroxidação lipídica, acelerada pelo aumento da temperatura, enquanto que a luz propicia a foto oxidação. O tipo de embalagem tem uma marcada influência na disponibilidade de ambos. O azeite virgem extra é usualmente vendido em garrafas de vidro mas cada vez é mais comum a disponibilização em garrafas de plástico, frequentemente associadas a produtos de menor valor comercial. O vidro e plástico incolor têm a desvantagem de não criar uma barreira à luz, permitindo a foto oxidação. Apenas uma embalagem opaca será plenamente eficiente, o que não é comum (Caponio et al 2005). O facto do consumidor não ver o produto que compra, como ocorre em garrafas opacas ou embalagens de inox, ainda é visto com alguma reserva. No que respeita ao oxigénio, apenas o vidro e o inox podem ser consideradas barreiras eficientes, sendo este um dos maiores problemas no plástico. Numa garrafa de politereftalato de etileno (PET) verificam-se maiores degradações logo após 3 meses de armazenamento em comparação com embalagens estanques à luz e oxigénio (Méndez e Falqué, 2007). A permeabilidade do PET ao oxigénio pode ser reduzida criando barreiras passivas, como a adição de filmes exteriores adicionais, ou por tecnologia ativa, utilizando PET com compostos com capacidade para bloquear a radiação UV ou reagir com o oxigénio impregnados na sua matriz molecular polimérica (Gambacorta et al, 2004, Cecchi et al, 2010). Existem também tecnologias simples para reduzir a disponibilidade em oxigénio, como reduzir o espaço de cabeça na garrafa ao mínimo ou preenchendo-o com um gás inerte, como o árgon ou azoto.

Contudo, toda e qualquer barreira será quebrada no momento de abertura da garrafa. Na verdade, cada vez que uma garrafa é aberta, o espaço livre da garrafa fica com ar novo, criando-se assim um constante acesso a oxigénio. Este

fenómeno aumenta com o uso porque a proporção de ar na garrafa aumenta também. As perdas de vitamina E, por exemplo, ao fim de 12 meses de acondicionamento aumentam de cerca de 25% numa garrafa cheia para 90% numa garrafa com metade do azeite, independentemente de ser acondicionada em vidro claro ou escuro (Rastrelli et al, 2002).

**Utilização doméstica do azeite:** de forma a preservar os atributos do azeite virgem extra, este deve ser consumido em cru, como tempero final em saladas frescas, sopas, etc. No entanto, um dos principais usos dos óleos vegetais em geral é para processamento culinário, como em assados e fritura. As temperaturas elevadas deste tipo de processamento inevitavelmente aceleram a degradação destes, não sendo exceção no caso do azeite. Conforme mencionado, pelo fato de ser rico em ácidos gordos monoinsaturados e ter um conjunto interessante de compostos antioxidantes na sua composição, o azeite é menos suscetível à oxidação do que a maioria dos óleos vegetais comerciais. Contudo, enquanto estes compostos antioxidantes são gastos na proteção dos ácidos gordos, os efeitos na saúde decorrente do seu consumo são reduzidos. Os compostos fenólicos, por exemplo, como o hidroxitirosol e seus derivados, ficam reduzidos a metade apenas com a fritura de batata fresca a 180°C durante 10 minutos, enquanto que a vitamina E praticamente desaparece ao fim de 3 a 6 horas de fritura (Santos et al, 2013). Assim, o processamento térmico deve ser reduzido ao mínimo e na menor temperatura tecnologicamente possível. Para aquecimento prolongado, poderá até considerar-se a adição de pequenas porções de azeite “fresco” para renovar os antioxidantes e prolongar a proteção. Ainda assim, os compostos fenólicos típicos do azeite virgem têm um sabor característico, deixando um flavor e sabor residual nos alimentos que pode não ser bem aceite por alguns consumidores. Por isso, para fritura os azeites mais “leves”, com menor teor em compostos fenólicos podem constituir uma alternativa interessante, utilizando-se para isso azeites extraídos de azeitonas mais maduras ou misturas com azeite refinado, a categoria comercial designada de “Azeite” (Santos et al, 2013).

## Conclusões finais

Apesar de não ser possível evitar, é possível reduzir a degradação do azeite se se conhecerem e compreenderem as suas principais “fraquezas” e se forem tomadas medidas efetivas.

Os armazenistas e vendedores devem ter particular atenção ao local de armazenamento, com luz reduzida e baixas temperaturas, de preferência dentro das caixas de cartão em que são usualmente transportados se não forem de material escuro.

Os consumidores devem adquirir azeite em função do consumo estimado e não comprar para guardar. Em casa, devem mantê-lo em local escuro e longe de fontes de calor e consumi-lo no mesmo ano de produção. Uma vez abertas, as garrafas devem ser consumidas rapidamente de forma a reduzir o contacto do azeite com o oxigénio. Para tempero devem usar-se os melhores azeites virgem extra ou adicionar apenas no final do processo culinário de forma a reter as suas características. Para processamento térmico, e uma vez que garantidamente parte das suas mais-valias serão reduzidas, poderá ser utilizado azeite de qualidade comercial inferior, nomeadamente a categoria “azeite”.

## Referências

Aparicio-Ruiz R, Aparicio R, García-González DL (2014). Does “best before” date embody extra-virgin olive oil freshness? *Journal of agricultural and food Chemistry*, 62, 554-556.

Caponio F, Bilancia MT, Pasqualone A, Sikorska E, Gomes T (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage, *European Food Research International*, 221, 92-98.

Cecchi T, Passamonti P, Cecchi P (2010) Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. *Food Chemistry*, 120, 730–735.

Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventós RM, Osada J, Owen RW, Visioli F (2006). Minor components of olive Oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*, 64, 20-30.

Méndez AI, Falqué E (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food control*, 18, 521-529.

Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 1199-1208.

Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, Vacca G, De Simone F (2002). Role of degradation of alfa-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 5566-5570.

Regulamento (UE) n.º299/2013 da Comissão de 26 de março de 2013 que altera o Regulamento (CEE) n.º2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*. 52-70.

Santos CSP, Cruz R, Cunha S, Casal S (2013). Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International* 54, 2016-2024.

## Azeite e óleos vegetais monoinsaturados na preparação de alimentos: escolhas idênticas?

**Carla Santos<sup>a</sup>, Lucía García<sup>a,b</sup>, Joana Martins<sup>a</sup>, Rebeca Cruz<sup>a</sup>, Sara Cunha<sup>a</sup>, Susana Casal<sup>a</sup>**

REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal; <sup>b</sup>Departamento de Física e Química Analítica, Faculdade de Ciências Experimentais, Universidade de Jaén, Espanha

### Introdução

A sociedade atual aspira por uma confeção de alimentos rápida, prática e de qualidade, tanto palatável como nutricional. Apesar do consumidor ter cada vez mais informação e consciencialização sobre a relação entre alimentação, nutrição e saúde, em particular no que diz respeito aos lípidos, a escolha de alimentos fritos continua a aumentar, suportada essencialmente pelos seus atributos sensoriais inigualáveis.

Do ponto de vista nutricional, e segundo a Direção Geral da Saúde (2005), os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) são os que melhor se adaptam às necessidades do nosso organismo e o seu consumo está associado com a diminuição do colesterol sanguíneo, principalmente a fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) designada como “mau colesterol”, e manutenção da integridade celular. Simultaneamente, do ponto de vista tecnológico, os lípidos monoinsaturados são mais resistentes à oxidação do que os polinsaturados, constituindo interessantes produtos para utilizar no processamento térmico, uma vez que a alternativa mais estável, as gorduras saturadas, são comprovadamente nefastas para a nossa saúde cardiovascular.

De entre os óleos vegetais disponíveis comercialmente, os principais fornecedores de ácidos gordos monoinsaturados são o azeite, seguido pelo óleo de colza e de amendoim (Decreto-Lei 106/2005). Esta característica torna estes óleos vegetais recomendados no processo de fritura. Nos países mediterrânicos o azeite é a gordura culinária mais utilizada na preparação de alimentos ao nível doméstico e industrial (Kalogianni et al, 2010; Carrageta, 2014), o óleo de amendoim é um dos recomendados para uso em refeitórios escolares portugueses (Circular n.º93/DSEEAS/DGE/2013) e o óleo de colza é muito comum em alguns países da Europa Central e de Leste (Booth e Gunstone, 2004).

É comum a utilização de óleos vegetais em diversos processos culinários, como na fritura, nos assados ou até no microondas. A fritura é caracterizada pela imersão de géneros

alimentícios num óleo ou gordura comestível a uma temperatura elevada (até 180°C) (Portaria n.º 1135/95) no qual o uso intermitente e repetido é uma prática comum. Resumidamente, é um processo de desidratação pelo calor com transferência de massa e reações físico-químicas simultâneas entre o óleo e o ar e entre o óleo e os componentes dos alimentos. Se por um lado estas reações promovem as tão desejadas propriedades organoléticas, com a formação de compostos de aroma, cor e textura, por outro lado reduzem a qualidade do óleo de fritura por hidrólise, oxidação, polimerização, isomerização e ciclização (Choe e Min, 2007; Zhang et al, 2012; Santos et al, 2013).

O presente trabalho pretende comparar a performance térmica de óleos vegetais monoinsaturados, incluindo o azeite, em situações reais de preparação de alimentos fritos, nomeadamente batata. Para tal determinaram-se parâmetros característicos de oxidação nos óleos e alguns componentes nutricionais importantes nas batatas, nomeadamente vitamina C, incorporação de gordura e consequentemente de vitamina E, sem descurar contaminantes resultantes do processamento alimentar, como a acrilamida, bem como a aceitação por parte de um painel de provadores.

### Material e métodos

#### Amostragem

As amostras de batata, variedade *Fontane*, foram palitadas em fresco e fritas, durante 6 minutos a 175°C numa fritadeira elétrica (Tristar, FR-6929), simulando a fritura efetuada nos restaurantes, sob a forma de fritura intermitente de 8 horas diárias, num total de 28h. Foi utilizado azeite virgem extra, óleo de amendoim e colza, este último de origem francesa uma vez que não é comum a sua venda em Portugal. A cada 4h foram recolhidos amostras de óleo e batatas para análise, com exceção do primeiro dia, que ocorreram passado 8h. As amostras de óleo foram armazenadas a 4°C,

em frascos fechados em atmosfera de azoto. Na batata foram realizadas algumas determinações imediatamente, sendo o remanescente triturado (Flama, Cesar, Portugal) e armazenado a -20°C até posterior análise.

#### Análises Físico-Químicas

Tanto nos óleos como nas batatas, a determinação de ácidos gordos e vitamina E foi efetuada de acordo com Casal et al (2010). Para avaliação do estado de oxidação dos óleos foram avaliados os compostos polares por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC), de acordo com Márquez-Ruiz et al (1996) e Dobarganes et al (2000), e o índice de *p*-anisidina em conformidade com a norma ISO 6885:2006. A gordura das batatas fritas foi extraída pelo método Soxhlet AOAC 945.16 e a vitamina C total foi quantificada como ácido ascórbico por cromatografia líquida (HPLC-UV), após redução do ácido desidroascórbico segundo Van de Velde et al (2012) e Chebrolu et al (2012). A acrilamida foi determinada após derivatização com xantidrol e posterior extração do composto formado (xantiloacrilamida) com acetato de etilo e análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). A extração dos voláteis realizou-se através da técnica Head-Space Solid-Phase Microextraction, sendo igualmente seguido de análise por GC-MS.

#### Análise Sensorial

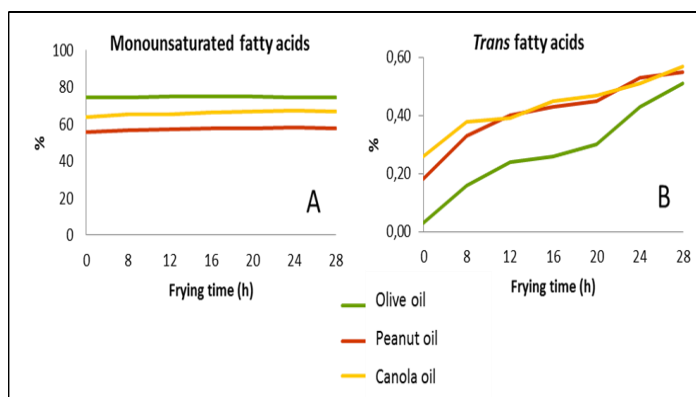
A análise sensorial foi realizada por um painel de provadores e baseou-se na análise descritiva quantitativa para avaliar as características sensoriais de batatas fritas nos três óleos monoinsaturados em estudo ao longo do tempo do estudo.

### Resultados e discussão

#### Resistência térmica e evidência de dano oxidativo

O comportamento térmico de um óleo pode ser avaliado pela monitorização, ao longo da fritura, dos níveis de ácidos gordos monoinsaturados e dos níveis de formas *trans* que inevitavelmente se vão formando. A formação de ácidos gordos *trans* tem sido usada como um indicador de degradação dos óleos (Talpur et al, 2012), estando a sua presença associada a uma maior incidência de doenças cardiovasculares (Direcção Geral da Saúde, 2005). Na figura 1 são apresentados os resultados experimentais obtidos com os 3

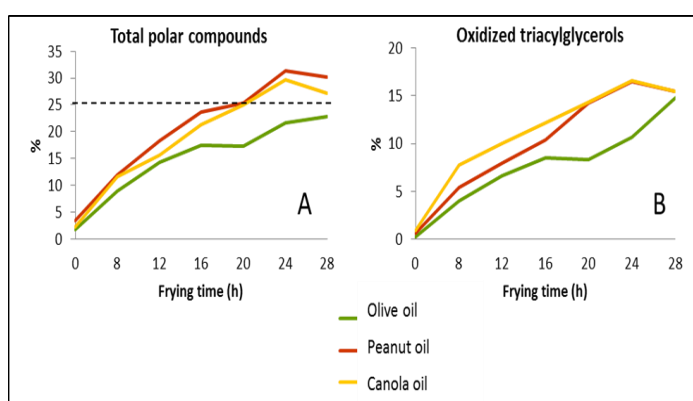
óleos em estudo, os quais apresentavam diferentes teores iniciais de ácidos gordos monoinsaturados: azeite (74%), óleo de colza (63%) e óleo de amendoim (56%), o que está de acordo com a legislação vigente (Regulamento (UE) n.º 299/2013; Decreto-Lei n.º106/2005). Comparativamente aos óleos vegetais com maior teor em ácidos gordos polinsaturados, como os óleos de girassol, de milho ou de soja, o facto de aqueles óleos apresentarem na sua composição maioritariamente ácidos gordos monoinsaturados, é de grande importância para a sua estabilidade oxidativa (Marinova et al, 2012). Já no que respeita ao nível de ácidos gordos *trans*, verificou-se um acentuado aumento ao longo do processo para todos os óleos. Como seria de esperar, dado tratar-se de óleos refinados, os óleos de colza e de amendoim, apresentavam um teor de formas *trans* inicial superior ao azeite, (0,18% e 0,26%, contra 0,01%). Durante o ensaio a evolução dos 3 óleos é semelhante mas isso não obsteu a que os teores finais se apresentassem sensivelmente idênticos para todos os óleos, de cerca de 0,4 %.



**Figura 1.** Evolução da percentagem de ácidos gordos monoinsaturados (A) e *trans* (B) ao longo do tempo de fritura.

A performance térmica dos óleos pode também ser avaliada pelo teor de compostos polares formados ao longo da fritura. Sob a designação comum de compostos polares incluem-se diversos compostos de degradação, nomeadamente produtos de hidrólise, de oxidação e de polimerização. De acordo com a lei portuguesa (Portaria n.º1135/95), o ponto legal de rejeição para óleos de fritura ocorre quando estes atingem 25% de compostos polares totais. A Figura 2 apresenta os resultados obtidos na mesma experiência de fritura referida anteriormente, tanto para a totalidade dos compostos polares (Figura 2 A) como especificamente para um dos

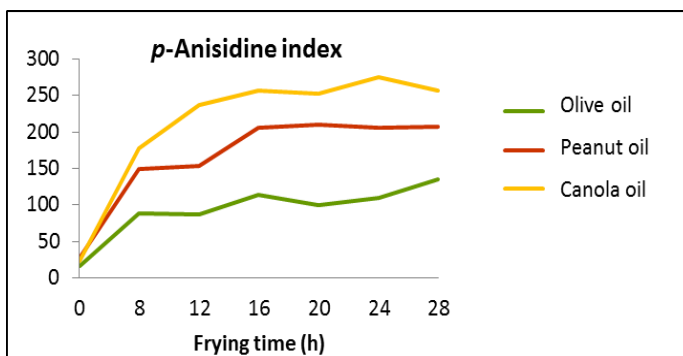
principais grupos específicos deste tipo de compostos, os triacilgliceróis oxidados (Figura 2B). Os resultados revelaram uma maior estabilidade à oxidação por parte do azeite comparativamente aos óleos vegetais monoinsaturados, tendo sido o único óleo que não atingiu o limite legal ao fim das 28h de experiência. Contudo, a análise da fração de triglicérides oxidados, potencialmente a que apresentará maiores efeitos deletérios para a saúde do consumidor, permitiu observar que também no caso do azeite se verifica um aumento contínuo ao longo do tempo de fritura, atingindo o final da experiência com teores equivalentes aos restantes dois óleos.



**Figura 2.** Evolução da percentagem de compostos polares totais longo do tempo de fritura (A) e, dentro destes, de triglicérides oxidados (B).

O estudo da natureza e da concentração dos compostos voláteis formados durante a fritura, como consequência da sua degradação térmica, é importante para auxiliar a compreensão das reações químicas que ocorrem durante o processo de fritura (Takeoka et al, 1996). De entre o grande número de compostos voláteis que podem ser encontrados, destacam-se os aldeídos (principalmente 2-alquenoais e 2,4-alcadienoais) formados por decomposição térmica dos hidroperóxidos (Fereidoon e Ying, 2005), cuja quantidade total é normalmente avaliada através do ensaio da *p*-anisidina, que corresponde por isso a um método indicativo do grau de oxidação secundária. Pela análise da figura 3, que apresenta os resultados obtidos para o índice de *p*-anisidina, pode concluir-se que os três óleos em estudo apresentaram diferentes graus de oxidação secundária, a qual foi maior no óleo de colza, seguindo-se o óleo de amendoim e o azeite. Tendo em conta a sua volatilidade, a análise detalhada deste tipo de compostos na batata foi efetuada por cromatografia gasosa, tendo-se verificado uma maior concentração de alcadienoais nas batatas fritas em óleo de colza e menor no

azeite, sendo compostos com reconhecido efeito tóxico (Katragadda et al, 2010),

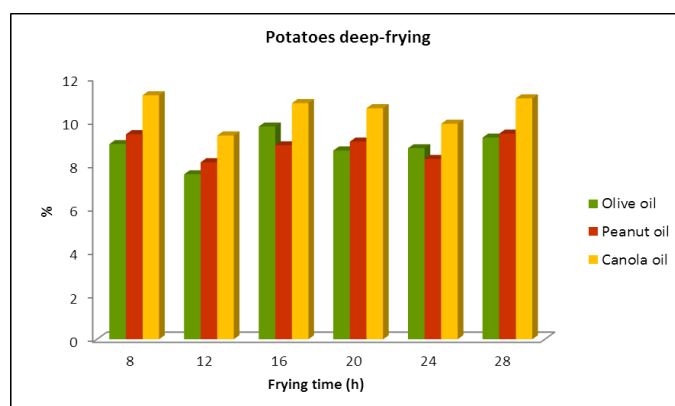


**Figura 3.** Evolução do índice de *p*-anisidina ao longo do tempo de fritura.

A formação de acrilamida durante a fritura da batata tem recebido muita atenção por parte da comunidade científica e dos consumidores em geral. Neste estudo, verificou-se que a formação de acrilamida é similar entre as batatas processadas nos três tipos de óleo monoinsaturados, num intervalo de dados de 800 a 1200 µg/Kg e ao longo do tempo de fritura.

#### Benefícios nutricionais

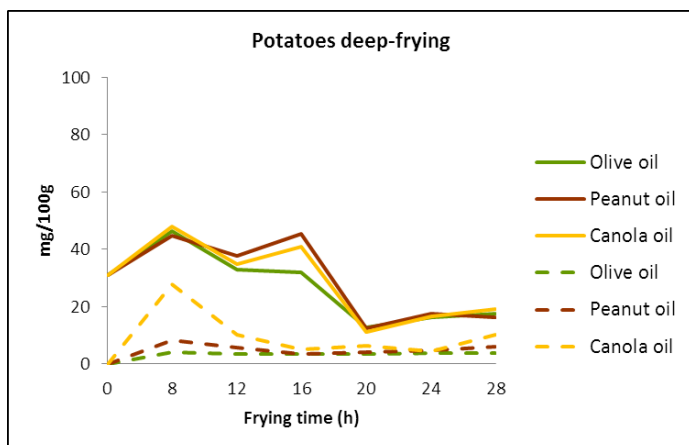
Do ponto de vista nutricional, a incorporação de gordura nas batatas fritas aquando da fritura aumenta o seu valor calórico mas simultaneamente enriquece-as em componentes dos óleos com interesse para a saúde, nomeadamente vitamina E e ácidos gordos essenciais. A figura 4 apresenta os resultados da % de gordura para as batatas ao longo do tempo de fritura. Pela sua análise verifica-se que as batatas fritas em azeite e em óleo de amendoim absorvem quantidades de gordura similares, inferiores às batatas fritas em óleo de colza. Contudo, o teor de gordura não aumenta com o tempo de fritura do óleo.



**Figura 4.** Evolução da percentagem de gordura ao longo do tempo de fritura.



O processo de fritura provoca redução da quantidade de água, apesar da vitamina C ser termossensível, verifica-se inicialmente uma concentração deste micronutriente, com um aumento de cerca de 50% quando comparado com a batata crua como é observado na Figura 5. Contudo, ao longo do tempo de fritura verifica-se uma visível diminuição na vitamina C provavelmente devido ao aumento do *stress* oxidativo nos óleos aquecidos, sem distinção entre estes. A vitamina E é inicialmente proporcional ao teor à quantidade de vitamina E dos óleos, maior no óleo de colza, seguida do óleo de amendoim e azeite. Contudo, verifica-se igualmente uma redução com o tempo de fritura em todos os óleos (Figura 5).



**Figura 5.** Evolução da vitamina C (linha contínua) e vitamina E (linha tracejada), sob a forma de mg/100g, ao longo do tempo de fritura.

No que diz respeito à análise sensorial, o painel de provadores não assinalou diferenças entre as batatas fritas confeccionadas no azeite e óleos vegetais monoinsaturados. Apesar do azeite apresentar um teor elevado em compostos fenólicos, o que confere um sabor mais adstringente em comparação aos outros óleos vegetais (Servili et al, 2014), este facto não constituiu fator de rejeição pelo painel.

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que, apesar de se ter avaliado óleos com composição de ácidos gordos semelhantes, monoinsaturados, o comportamento térmico é bastante diferente. O azeite virgem extra revelou uma maior estabilidade à oxidação em comparação ao óleo de amendoim e de colza, sendo suportada pelos diferentes indicadores de oxidação térmica.

Para o consumidor, do ponto de vista nutricional, aconselha-se, ainda que não tenha atingido o limite legal de rejeição, o uso de óleos até 8h de fritura pois verificam-se melhores teores de vitaminas C e E, sem grande prevalência de produtos de oxidação, e consequentemente melhor aproveitamento pelo nosso organismo.

## References / Referências Bibliográficas

- AOAC 945.16, 2005. Official Method of Analysis, Oil in Cereal Adjuncts. 18th Ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD;
- Booth EJ, Gunstone FD, 2004. Rapeseed and Canola Oil: Production, Processing, Properties, and Uses. In: Gunstone FD, editor. Blackwell; p. 1-15;
- Carrageta MO, 2014. A dieta Mediterrânica e as doenças cardiovasculares. Revista Factores de Risco, 31, 24-29;
- Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA, 2010. Olive oil stability under deep-frying conditions. Food and Chemical Toxicology. 48(10):2972-9;
- Chebrolu KK, Jayaprakasha GK, Yoo KS, Jifon JL, Patil BS, 2012. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. LWT - Food Science and Technology, 47, 443-449;
- Choe E, Min DB, 2007. Chemistry of deep-fat frying oils. Journal of Food Science. 72(5):R77-R86;
- Circular nº.: 3/DSEAS/DGE/ 2013, 2013. Orientações sobre ementas e refeitórios escolares - 2013/14. Direção Geral da Educação;
- Decreto-Lei n.º106/2005 de 29 de junho, 2005. Diário da República. I Série-A, n.º123, 4034;
- Direção Geral da Saúde, 2005. Gorduras. Coleção: Princípios para uma Alimentação Saudável. ISBN: 972-675-144-6;
- Dobarganes MC, Velasco J, Dieffenbacher, A, 2000. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. Pure and Applied Chemistry. 72, 1563-1575;
- Fereidoon S, Ying Z, 2005. Lipid Oxidation: Measurement Methods. In: Fereidoon S, editor. Bailey's Industrial Oil and Fat Products; p. 357-85;
- ISO 6885:2006. Animal and Vegetable Fats and Oils – Determination of Anisidine Value;
- Kalogianni EP, Karastogiannidou C, Karapantsios TD, 2010. Effect of potato presence on the degradation of extra virgin olive oil during frying. Int J Food Sci Tech. 45:765-775;
- Katragadda HR, Fullana A, Sidhu S, Carbonell-Barrachina AA, 2010. Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. Food Chemistry. 120(1):59-65;

Marinova EM, Seizova KA, Totseva IR, Panayotova SS, Marekov IN, Momchilova SM. 2012. Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature. *Bulgarian Chemical Communications*. 44(1):57-63;

Márquez-Ruiz G, Tasioula-Margari M, Dobarganes M, 1995. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1171-1176;

Portaria n.º 1135/95, 1995. *Diário da República*. I Série-B, n.º214, 5836;

Regulamento (UE) n.º299/2013 da Comissão de 26 de Março de 2013 que altera o Regulamento (CEE) n.º2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*. 52-70;

Santos CSP, Cruz R, Cunha SC, Casal S, 2013. Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*. 54(2):2016-24;

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A, 2014. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*. 3, 1-23;

Takeoka G, Perrino C, e Buttery R, 1996. Volatile constituents of used frying oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (3):654-60;

Talpur MY, Sherazi STH, Mahesar SA, Naz S, Kara H, 2012. Impact of frying on key fatty acid ratios of canola oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114(2):222;

Van de Velde F, Pirovani ME, Cámara MS, Güemes DR, del H. Bernardi CM, 2012. Optimization and Validation of a UV-HPLC Method for Vitamin C Determination in Strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), Using Experimental Designs. *Food Anal. Methods*. 5:1097-1104;

Zhang Q, Saleh ASM, Chen J, Shen Q, 2012. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. *Chemistry and Physics of Lipids*. 165(6):662-81.

## Óleo de louro

**Maria do Céu Costa**

[p1658@ulusofona.pt](mailto:p1658@ulusofona.pt)

Coordenadora do Grupo de Ciências Alimentares e Fitoquímica (FSP) do Centro de Biociências e Tecnologias da Saúde (CBIOS) da COFAC (Cooperativa de Animação Cultural, Crl), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT)

### Introdução

A utilização dos frutos do loureiro na ilha da Madeira para o fabrico de um óleo conhecido como azeite de louro resulta da colheita e expressão de bagas maduras, que são recolhidas entre setembro e novembro.

Na tradição popular o óleo é considerado (Rivera & Obon, 1995) um “remédio milagroso”, curando quase todos os males, internos e externos, sobretudo como cicatrizante, para problemas de circulação sanguínea, casos de gangrena e do tétano, reumatismo, males de estômago, da garganta e do fígado.

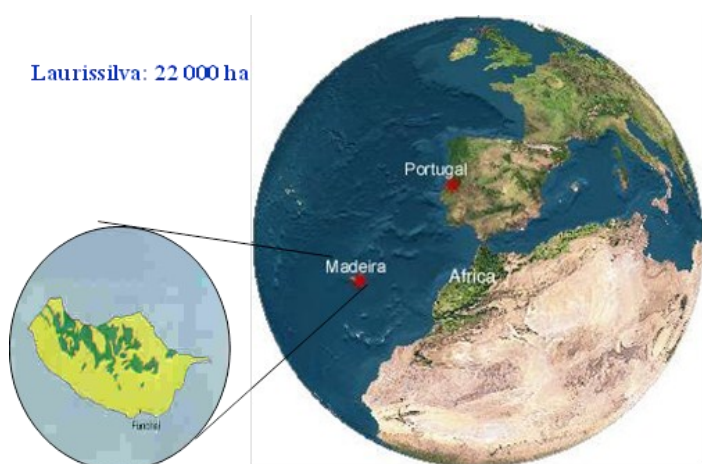
Uma colher de óleo de louro, duas vezes por mês, é considerada popularmente (Com. pessoal, 2001) a dose ótima na prevenção de doenças cardiovasculares. O óleo é aplicado e/ou ingerido como preparação anti-infecciosa e para tratamento de apoplexia (uso de longo termo). O óleo de louro é também usado para friccionar as articulações com o objetivo de diminuir as dores reumáticas. Este tipo de óleo é um óleo fixo, extraído de uma das espécies endêmicas arbóreas mais abundantes na floresta Laurissilva no arquipélago da Madeira (Figura 1), do género *Laurus* spp. (Rivas-Martínez, *et al.*, 2002), conhecida como “Laurissilva”, também endémico dos Açores e as ilhas Canárias. Das mesmas espécies pode ser extraído também um outro tipo de óleo, volátil, obtido por hidrodestilação das partes aéreas (folhas e flores) que se designa tecnicamente como óleo essencial de louro.

### Taxonomia

Durante décadas pensava-se que existia nos Açores, Madeira e Canárias a mesma espécie de louro, *Laurus azorica* (Seub.) Franco. Mas, em 2002, determinou-se que a espécie presente nos Açores é *Laurus azorica* (Seub.) Franco sendo distinta da existente na Madeira e Canárias (Figura 2) e que foi classificada como *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Días, J.C. Costa & C. Aguiar (Rivas-Martínez, *et al.*, 2002). Aparecem no nome taxonómico o binome latino em itálico, seguido do nome (s) do (s) classificador (es), que neste caso são vários por se ter tratado de uma excursão de taxonomistas. As diferentes espécies, *Laurus* spp., crescem espontaneamente na região da Macaronésia e em particular na ilha da Madeira, onde é a espécie arbórea mais abundante, protegida, e com tendência à expansão.



**Figura 2.** Louro da Madeira, *Laurus novocanariensis*, que cresce em locais sombrios e húmidos



**Fig. 1.** Floresta de Laurissilva no arquipélago da Madeira, Portugal.

Estão publicados alguns estudos científicos com a espécie correspondente ao táxone *Laurus novocanariensis* Rivas Mart. *et al.*, tendo para o efeito sido indispensável que os grupos de investigação tenham depositado em herbário um exemplar de cada colheita diferente que deu origem a um estudo analítico (Ferrari, *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2005; *ibid*, 2005). Existe também uma patente concedida para a utilização de uma composição farmacêutica baseada em óleo de louro como agente anti-inflamatório (Castilho, Rodrigues, Costa e Corvo, 2002). De notar que em relação ao *Laurus nobilis* L., esta espécie é pouco frequente nos Açores e Madeira e caso apareça é cultivado em quintais e afins.

A flora medicinal da Madeira e Porto Santo é constituída por 259 espécies (Rivera & Obon, 1995) sendo o *Laurus novocanariensis* uma das 30 consideradas mais importantes, por ter a maior lista de usos registados na prática tradicional. São utilizadas diversas partes morfológicas para uso terapêutico, desde os frutos, ao chá dos frutos, óleos essenciais, infusão das folhas e o óleo de expressão dos frutos (bagas). Este óleo fixo é incorretamente designado “azeite” porque é extraído por processos tradicionais idênticos aos aplicados em lagares de produção de azeite, a partir dos frutos, bagas escuras como a azeitona (Figura 3).



**Figura 3-** Produção de óleo fixo da baga de louro da Madeira, *Laurus novocanariensis*.

Até 2002 (Castilho, Rodrigues, Costa e Corvo, 2002), este óleo não tinha sido objeto de nenhum estudo que caracterizasse o tipo e concentração dos seus constituintes ou que estabelecesse a relação entre a sua composição química e as

atividades terapêuticas que lhe são atribuídas. No entanto, em toda a ilha da Madeira, este óleo é extraído dos frutos e vendido no mercado, em lojas e farmácias, e utilizado pelas famílias. Onde quer que haja uma comunidade de emigrantes madeirenses parece mantida a tradição da sua utilização com intenções profiláticas e/ou terapêuticas (Com, pessoal, 2000).

O estudo da composição do óleo obtido pela expressão a frio das bagas mostrou que é principalmente constituído (ca. 85%) por triacilgliceróis (TAG) com vestígios de ácidos gordos livres (FFA) e diacilgliceróis (4,5). Dos 15% restantes, compostos voláteis são responsáveis por ca.10 %, onde predominam o *trans*-ocimeno e o germacreno D. O ácido oleico (30 %) e o ácido linoleico (20 %) são os principais ácidos gordos insaturados enquanto o ácido láurico (18 %) e o ácido palmítico (até 22,5 %) são os principais ácidos gordos saturados na fração lipídica neutra. O óleo tem um teor de esteróis da mesma ordem de azeite de oliveira, com o predomínio de  $\beta$  - sitosterol (84 %). Duas lactonas sesquiterpénicas, a costunolida e a desidrocostonolida, representam 5% da composição total (Castilho, Costa, Rodrigues e Partidário, 2005). Estes componentes, apesar de minoritários, são potencialmente essenciais para a atividade anti-inflamatória, ainda que em sinergia potencial com os ácidos gordos presentes. De notar que, para além do uso tradicional, muitos estudos na última década têm demonstrado que, apesar da sua toxicidade, a costunolida e desidrocostonolida isoladas são modelos interessantes para o desenho de compostos com ação anticancerígena (Whipple *et al.* 2013).

### Propriedades biológicas

Têm sido realizados alguns estudos para esclarecer as propriedades terapêuticas atribuídas a este óleo. Verificou-se que, quando administrado oralmente a ratos Wistar, o óleo de louro da Madeira mostra um efeito inibidor significativo no modelo adjuvante da artrite reumatoide de rato (Castilho, Rodrigues Costa and Corvo, 2002), onde a redução do inchaço foi máxima na dose mais elevada utilizada (0,5 e 1 mL). Ficou evidenciada uma ação dose-dependente.

Contudo, o produto que é correntemente utilizado como condimento na Madeira é a folha do louro (*Laurus novocanariensis*) de forma idêntica à folha do louro espontâneo do continente (*Laurus nobilis*), ou seja, por contacto com os

alimentos a temperar, normalmente em cru e principalmente carnes. Não se conhece que seja utilizado tradicionalmente qualquer óleo de louro para condimento alimentar.

De facto os constituintes químicos das folhas de *Laurus nobilis*, utilizadas como condimento (Natural sources of flavourings (Rep No 1), 2000), são conhecidos como aromatizantes, apesar de serem também conhecidas algumas propriedades alergénicas de compostos do óleo, presentes em quantidades diminutas quando as folhas são utilizadas para condimentar. Estes compostos são: metileugenol (2,0-2,6 ppm); alquênil benzenos (eugenol 1,4-2.0%, metileugenol 1.7-11.8%), eucaliptol (34-53%).

A informação ao consumidor para a utilização de produtos para administração oral à base de *Laurus novocanariensis* depende da sua classificação como alimento comum (folha de louro) ou outro tipo de produto adequadamente estudado e caracterizado para introdução no mercado.

Quando se trata de desenvolver produtos alimentares para utilização benéfica relacionada com a fisiologia humana podem ser aplicáveis alegações nutricionais e de saúde regulamentadas a nível comunitário pelo Regulamento CE n.º 1924/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro.

No caso de se evidenciarem características farmacológicas, desde a entrada em vigor do Decreto-Lei 176/2006, de 30 de Agosto (e sucessivas atualizações, nomeadamente incluindo até ao Decreto-Lei n.º 128/2013 de 5 de setembro), que procedeu à transposição da legislação comunitária, nomeadamente da Diretiva 2004/24/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março de 2004, existe a possibilidade de submissão de pedidos de registo de medicamentos tradicionais à base de plantas (artigos 141º a 147º). Só podem ser objeto deste pedido de registo de utilização tradicional os medicamentos à base de plantas que, cumulativamente:

a) Tenham indicações exclusivamente adequadas a medicamentos à base de plantas e, dadas a sua composição e finalidade, se destinem e sejam concebidos para serem utilizados sem vigilância de um médico para fins de diagnóstico, prescrição ou monitorização do tratamento;

b) Se destinem a ser administrados exclusivamente de acordo com uma dosagem e posologia especificadas;

c) Possam ser administrados por uma ou mais das seguintes vias: oral, externa ou inalatória;

d) Já sejam objeto de longa utilização terapêutica, de acordo com os dados ou pareceres referidos na alínea m) do n.º 2 do artigo seguinte;

e) Sejam comprovadamente não nocivos quando utilizados nas condições especificadas, de acordo com a informação existente e reputada suficiente;

f) Possam demonstrar, de acordo com informação existente e reputada suficiente, efeitos farmacológicos ou de eficácia plausível, tendo em conta a utilização e a experiência de longa data.

Não existe nenhuma Monografia do Louro como medicamento à base de plantas, que seria encontrada na página da Agência Europeia do Medicamento (cf. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/herbal\\_search.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/herbal_search.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d)).

Portanto, apesar dos inúmeros estudos de ação farmacológica *in vitro* publicados, será ainda necessário existirem mais estudos do modo de ação, ensaios pré-clínicos e de toxicidade, e ensaios clínicos, para esclarecer todo o potencial terapêutico do óleo de *Laurus spp.* como medicamento, com um Dossier de Introdução no Mercado (AIM) que consagre a Qualidade e os requisitos mínimos de Segurança para garantia do seu uso em conformidade com as normas internacionais de boas práticas de fabrico e de distribuição. Não existindo esse dossier, o óleo de louro não deve ser utilizado para fins medicinais. A comercialização de óleo de louro também não se enquadra no regulamento aplicável aos suplementos alimentares, visto que não se destina a suprir necessidade de uma dieta equilibrada.

## Referências

Comunicação pessoal (2001) de várias pessoas entrevistadas em vários locais da Ilha da Madeira (Funchal; Curral das Freiras; Ponta do Pargo),

Comunicação pessoal (2000-2002) de alunos do Curso de Química Aplicada, Universidade da Madeira).



Decreto-Lei n.º 128/2013, de 5 de setembro procede à oitava alteração ao Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, que estabelece o regime jurídico dos medicamentos de uso humano, alterado pelos Decretos-Leis n.ºs 182/2009, de 7 de agosto, 64/2010, de 9 de junho, e 106-A/2010, de 1 de outubro, pelas Leis n.ºs 25/2011, de 16 de junho, 62/2011, de 12 de dezembro, e 11/2012, de 8 de março, e pelo Decreto-Lei n.º 20/2013, de 14 de fevereiro, transpondo para o ordenamento jurídico nacional a Diretiva n.º 2009/35/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de abril de 2009, relativa às matérias que podem ser adicionadas aos medicamentos tendo em vista a sua coloração, a Diretiva n.º 2011/62/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de junho de 2011, que altera a Diretiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano, para impedir a introdução na cadeia de abastecimento legal, de medicamentos falsificados

Castilho, P.C.; Costa, M.C.; Rodrigues, A. and Partidário, A. (2005). Characterization of Laurel Fruit Oil from Madeira Island, Portugal, J. Am Oil Chem. Soc., JAOCS 82, 863–868.

Castilho, P.C.; Costa, M.C.; Rodrigues, A.I.; Branco, P.; Costa, M. (2005). Characterization of Triacylglycerols in Madeira Laurel Oil by HPLC-APCI-MS, J. Am Oil Chem. Soc., 81, 913-919.

Castilho, P.; Rodrigues, A.I.; Costa, M. C.; Corvo L. (2002). Patente de invenção nº 102839 para "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA BASEADA EM ÓLEO DE LOURO (L. azorica (Seub) Franco) E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO EM MAMÍFEROS.

Ferrari, B. ; Castilho, P.C.; Tomi, F.; Rodrigues, A.I.; Costa, M.C. and Casanova, J. (2005). Direct Identification and Quantitative Determination of Costunolide and Dehydrocostuslactone in *Laurus novocariensis* Fixed Oil using <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy, Phytochem. Anal., 16, 104-107.

Natural Sources of Flavourings (Rep No 1), Council of Europe (2000). In: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients (5th Ed., volume I) by CRC Press Inc, Boca Raton, FL 2005.

Rivas-Martínez, S.; Díaz, T.E.; Fernández-González, F.; Izco, J.; Loidi, J.; Lousã, M. & Penas, A. (2002). Vascular Plant Communities of Spain and Portugal. Addenda to the Syntaxonomical checklist of 2001, Part II. Itinera Geobotanica 15(2): 703.

Rivera D.; C. Obón (1995). The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review, Journal of Ethnopharmacology, 46, 73-93.

Whipple et al. (2013), Rebecca A Whipple, Michele I Vitolo Amanda E Boggs, Monica S Charpentier, Keyata Thompson and Stuart S Martin (2013). Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting detyrosinated tubulin independent from NF-κB inhibition, Breast Cancer Research 2013, 15:R83. In: <http://breast-cancer-research.com/content/15/5/R83>.

**Ficha Técnica:**

**Riscos e Alimentos, nº 7  
junho 2014**

**Propriedade:  
Autoridade de Segurança  
Alimentar e Económica  
(ASAE)**

**Coordenação Editorial, Edição e Revisão:  
Departamento de Riscos  
Alimentares e Laboratórios  
(DRAL) / UNO**

**Distribuição:  
DRAL / UNO**

**Periodicidade:  
Semestral**

